



# **FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES**

---

**Grado en Ciencias del Mar**

## **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

Idoneidad del género *Ruditapes sp* como  
organismo bioindicador en el análisis del riesgo  
ambiental de fuentes de estrés en ecosistemas  
marinos.

Estudiante: Víctor Sanz Fernández


Tutora: María Laura Martín Díaz

Puerto Real, 07/07/2015



## Idoneidad del género *Ruditapes sp* como organismo bioindicador en el análisis del riesgo ambiental de fuentes de estrés en ecosistemas marinos.

Memoria presentada por el Alumno Víctor Sanz Fernández para optar al Grado de Ciencias del Mar por la Universidad de Cádiz.

Fdo 

Puerto Real, 07/07/2015

LA PRESENTE MEMORIA FIN DE GRADO HA SIDO TUTORIZADA POR MARÍA LAURA MARTÍN DÍAZ DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Laura', enclosed within a circular scribble.

La Tutora

## **Gracias.....**

A la doctora M<sup>a</sup> Laura Martín Díaz, tutora de mi TFG, por enseñarme y guiarme con paciencia, por brindarme la oportunidad en aquella entrevista de alumno colaborador, de poder conocer un poquito mejor este maravilloso mundo llamado “Ciencia” tan costoso al igual que gratificante, por ordenarme la cabeza, por tus críticas constructivas, por asesorarme lo mejor posible y sobre todo por esa sonrisa tan llena de energía positiva que siempre me levanta el ánimo. Por darme tiempo.

A las doctoras Remedios Cabrera e Ivone Alejandra Czerwinski, por su enorme paciencia conmigo, por darme la oportunidad de sentirme “estadístico pesquero” durante nuestros trabajos, poniendo a mi servicio todos los recursos habidos y por haber, cuidando de que todo saliera bien. Gracias por emplear parte de vuestro valiosísimo tiempo en ser mis maestras, siempre rebosando simpatía y amabilidad. Por vuestra constante y amable cooperación. Y gracias porque para mí sois un ejemplo de buen hacer.

A Rubén, por esas tardes de Skype y de risas discutiendo datos incoherentes e incluso irreales. A mi compi perrete de entrenos, Balloon, por aguantarme en esos entrenos interminables de barras, horas y mucha mucha playa, por tu compañía y sobre todo gracias por ayudarme a mejorar mi relación con el mundo animal, donde quieras que estés siempre te recordaré Amigo.

A “mi banda del patio” Mike, Robert, Pedro, Chiquero, Pernía y Diego, por todos esos momentos de risas y discusiones por saber quién gana al mus o al risk, por esos debates de educación, matemáticas, macroeconomía, política, chicas... y un sinfín de temas a altas horas de la madrugada en la parada de Pedro después de nuestra tradicional cenita por el centro, por todos esos ratos que hemos pasado juntos y que en un futuro espero que sigamos pasando. Chicos me siento muy orgulloso de pertenecer a la “banda” y sobre todo de vosotros porque sois unas personas extraordinarias. Gracias por aceptarme tan bien en ese curso de bachillerato que tantos recuerdos bonitos conservo en mi mente.

A Tania, mi profe de inglés favorita, por hacer que durante esos dos años de bachillerato se me hayan pasado como un chasquido de dedos, por ser la representación humana del bolso de Mary Poppins: imprevisible, divertida, siempre llena de sorpresas y regalos. Gracias por esos paseos veraniegos por las calles de Madrid, por los batidos y por acompañarme a frikadas de invertebrados cartilaginosos. Por enseñarme tantas cosas y hacer el tonto. Es un gustazo tenerte tan cerca siempre aunque nos separen muchos kms, eres GENIAL.

A Natalia por supuesto, de su queridísimo Ayamonte, por estar en los buenos y en los malos momentos durante nuestros cuatro años de grado, me llevo una gran amiga para muchos años. A Manu, mi acuarista preferido, por ayudarme a mejorar mis relaciones con otras personas, por enseñarme que la vida son tanques, avances y retiradas, por esas tardes de estrategias que con tanta maestría me explicabas, por escucharme y sobre porque esas cosillas habría que verlas...

A Paula, por alentarme a querer superarme y hacerme ver que era capaz de conseguir cualquier reto, por creer en mí aún cuando ni yo mismo lo hacía, por enseñarme el carácter de una verdadera loba en un mundo de cazadores y en definitiva porque como digo gracias por ser una persona excepcional y especial. A Claudia, Oh Clau que voy a decir de ti que no te haya dicho ya, gracias por escucharme, aconsejarme, devolver mis pies al suelo cuando era necesario y enseñarme a ver la vida con otros ojos. Por una enorme amistad firme y sin condiciones. Por ser un apoyo importante en esta odisea llamada Ciencias del Mar que tanto esfuerzo nos ha costado sacar.

A Miguel, porque como bien tú dices ya no somos amigos, somos hermanos, que suerte tengo de tener a mi lado una persona como tú, un pilar fundamental.

A mi abuelo Paco, que donde quieras que estés siempre me has llevado por el buen camino y has intentado hacer que me convierta en la mejor persona posible, GRACIAS abuelo siempre estarás en mi corazón.

A mi hermana Natalia, que con toda la paciencia del mundo ha sido capaz de aguantarme y ayudarme con el inglés y otras cosillas. Y a pesar de nuestros enfados, sólo ha tenido palabras de ánimo para mí siempre. Nunca dejará de sorprenderme lo maravillosa que puedes llegar a ser.

A mi padre Armando, por su paciencia, su esfuerzo y abrazos, por enseñarme que en esta vida todo se consigue con trabajo y buen hacer. Gracias papá;

El agradecimiento más importante con permiso de mi hermana y padre, es para ti por darme lo más valioso que tengo LA VIDA, porque todo lo que soy es gracias a ti, mamá, Marisa, porque solo las mujeres traen a este mundo hombres de verdad, tú lo eres. Por ser la fuente y el motor de mi vida. No hay palabras para expresar todo lo que has sido para mí en los buenos momentos y en los peores. En definitiva, gracias Familia porque todos sois lo más bonito que tengo en esta vida.

“Si la vida te pisa desenvaina una sonrisa y vuélvete a levantar” (Mago de Oz).

# Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN .....	6
2.1. Hipótesis de partida y objetivos.....	6
2.2. Justificación de la revisión bibliográfica .....	6
3. METODOLOGÍA. ....	7
3.1. Procedimiento de búsqueda y clasificación de la información.....	7
3.2. Análisis estadístico .....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4.1 Aclimatación.....	14
4.2. Ensayos de laboratorio y campo .....	15
4.3. Ensayos de toxicidad agudos y crónicos. Bioacumulación. ....	19
4.3.1. Toxicidad aguda: CE <sub>50</sub> o CL <sub>50</sub> .....	22
4.3.2. Toxicidad crónica.....	23
4.3.3. Bioacumulación .....	26
4.4. Incertidumbres y mejoras.....	26
4.5. Nuevas fuentes de estrés ambiental: Nuevos retos .....	28
5. CONCLUSIONES .....	28
6. BIBLIOGRAFÍA.....	29
7. ANEXO .....	33
7.1. Código en lenguaje R para la realización de los diagramas de sectores.....	33
7.2. Tablas de aclimatación .....	35
7.3. Tablas de respuestas .....	42
7.4. Listado de acrónimos y abreviaturas tablas .....	51
7.5. Bibliografía tablas.....	52

## RESUMEN

La evaluación del riesgo ecológico o ambiental (ERA), permite estimar los efectos adversos probables o existentes que puedan provocar diferentes fuentes de estrés y otras actividades antropogénicas en los ecosistemas. Las investigaciones realizadas hasta la fecha han demostrado una creciente evidencia sobre el importante papel que juegan los invertebrados acuáticos en la evaluación del riesgo de diferentes fuentes de estrés antropogénicas y ambientales en los ecosistemas marinos. La presencia de nuevos contaminantes en el medio (contaminantes emergentes) y las variaciones que conlleva el cambio climático global, hacen necesario el análisis crítico de trabajos de investigación publicados en los cuales *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum* (moluscos bivalvos) se utilizaron como organismos bioindicadores, con el fin de analizar la idoneidad de ambas especies. Los resultados mostraron que el género *Ruditapes sp* es sensible a un amplio espectro de fuentes de estrés y que sus respuestas biológicas están vinculadas a las concentraciones de exposición o dosis. Con el presente trabajo, se ha demostrado que ambas especies de bivalvos constituyen especies bioindicadoras idóneas en los procesos de evaluación de riesgo ambiental, tanto para fuentes de contaminación antropogénica como para alteraciones de variables ambientales.

## ABSTRACT

The evaluation of the ecological or environmental risk (ERA), allows the determination of existing or likely adverse effects that might provoke sources of stress and other activities anthropogenic ecosystems and their components, always using scientific methodologies in order to determine the environmental impact and the potential risk to human health. The researchs conducted to date have shown increasing evidence on the role important aquatic invertebrates in the evaluation of the risk of different sources of anthropogenic and environmental stressors on marine ecosystems. The presence of new pollutants in the environment ( emerging pollutants ) and changes that come with global climate change, necessitate the critical analysis of published research papers in where *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* ( bivalve molluscs ) were used as bioindicators organisms, in order to examine the suitability of both species. The results showed that gender *Ruditapes sp* is sensitive to a broad spectrum of sources of stress and their biological responses are linked to exposure concentrations or doses. With this present work, it has been shown that both species of bivalves are suitable bioindicator species in the process of environmental risk assessment , as much for sources of anthropogenic pollution as for alterations of environmental variables.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas costeros son zonas de gran relevancia para los estados costeros ya que de ellos depende la mayoría de sus actividades económicas. La enorme concentración de población que albergan causa que el medio marino local esté sometido al impacto de numerosas actividades antropogénicas, que llevan consigo el vertido de una inmensa variedad de sustancias xenobióticas, tales como PAHs (hidrocarburos policíclicos aromáticos), PCBs (bifenilos policlorados), metales y TBTs (tributilestano) de forma directa e indirecta (MAGRAMA, 2010). En los últimos años, la liberación directa y continua de nuevas sustancias como los contaminantes emergentes (fármacos, productos de cuidado personal, difenil-eter-polibromados (PBDEs), compuestos moduladores de la actividad endocrina (EMCs), productos relacionados con la nanotecnología y microplásticos) ha provocado la aparición de nuevas preocupaciones ambientales, unido a las variaciones de parámetros físico-químicos provocados por el cambio climático global ( $T^a$  (temperatura), salinidad, pH, etc.). Esta presión antropogénica constituye una fuente potencial de estrés ambiental en los ecosistemas marinos costeros, tal y como describen diversos autores (Garg y *col.*, 2009; Aguirre-Martínez y *col.*, 2013; Casatta y *col.*, 2015; Maranhão y *col.*, 2015).

Como consecuencia, el interés por la salud de los ecosistemas costeros ha llevado a la intensificación de la evaluación del riesgo ecológico o ambiental (ERA), centrado esencialmente en la biodisponibilidad y efectos biológicos en la biota marina y la salud humana. Este procedimiento permite estimar, a partir del análisis y la gestión del riesgo, los efectos adversos probables o existentes que puedan provocar diferentes fuentes de estrés y otras actividades antropogénicas en los ecosistemas y sus componentes, siempre utilizando metodologías de rigor científico (Depledge y Fossi, 1994). En este aspecto, las especies bioindicadoras juegan un papel muy importante en lo que se refiere a la evaluación de la exposición, efecto y relación dosis-respuesta, cuando se realiza la fase de análisis del riesgo ambiental. Un bioindicador se define como aquel organismo que proporciona información sobre las condiciones medio ambientales en su hábitat por su presencia, su ausencia o su comportamiento. Entre los diferentes tipos de organismos existentes empleados para la valoración del riesgo ambiental, los moluscos bivalvos han sido ampliamente utilizados a lo largo de la historia en investigaciones ecotoxicológicas acuáticas (Bebiano, 1995), como especies bioindicadoras habiendo sido determinadas en dichas especies, respuestas que informan sobre la biodisponibilidad y efecto de contaminantes a través de la determinación de biomarcadores.

El aspecto de bioindicador y biomarcador puede ser realmente útil como herramienta sensible para la evaluación del riesgo ambiental y humano (Depledge y Fossi, 1994). El biomarcador es cualquier respuesta biológica a un contaminante químico a nivel sub-individual medido dentro del

organismo o en sus productos, que indica una desviación del estado del organismo que no podría ser detectado en el organismo intacto. Son por tanto indicadores a corto plazo de efectos adversos que puede ocurrir a largo plazo. Las medidas de biodisponibilidad a través de valores de bioacumulación y biomagnificación de contaminantes, constituyen una información de gran relevancia en la valoración del riesgo para la salud humana cuando se hace referencia a especies de consumo.

Existen varias razones por las que los invertebrados, y en particular los moluscos bivalvos, son preferibles como especies bioindicadoras para la evaluación del riesgo ecológico frente a los vertebrados. La primera de ellas es su elevada abundancia, constituyen el 95 % de todas las especies de animales (Barnes, 1968), lo que origina que los invertebrados sean los componentes principales de los ecosistemas, siendo sus poblaciones tan numerosas que la toma de muestra no supone una variación significativa en la dinámica poblacional. Además, su extensa distribución, su estilo de vida sedentario y su facilidad de recolección hacen que, por todos estos motivos, los moluscos bivalvos sean candidatos idóneos en los procesos de ERA en el medio ambiente marino. Entre las diferentes clases de bivalvos el género *Ruditapes*, más concretamente sus especies *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*, se han empleado con éxito en todo el mundo como monitores biológicos de presiones antropogénicas, o bioindicadores (Bebianno, 1995; Roméo y Gnassia-Barelli, 1997; Smaoui-Damak y col., 2009; Seram y Bebianno, 2010; Ramos-Gómez y col., 2011; Wang y col., 2012).

*Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) (*Figura 1*), la almeja europea, puede ser hallada en el Atlántico, desde el norte de África hasta el sur de Escandinavia incluyendo el mar Mediterráneo (Jensen y col., 2004). Las poblaciones naturales de esta especie se desarrollan en los sedimentos arenosos y fangosos de bahías, estuarios y lagos costeros (Gosling, 2003).



*Figura 1. Ejemplar de Ruditapes decussatus. Caño Sancti Petri (San Fernando)-2005. (Fuente: A. M. Arias, Ictiolum, 2005).*

*Ruditapes philippinarum* (Adams y Reeve, 1850) (*Figura 2*), comúnmente conocida como almeja japónica, es una especie endémica de la región Indo-Pacífica. Fue introducida en el Atlántico norte y en el Mediterráneo a principios del 1970 con fines comerciales (Jensen y col., 2004), debido



a que *Ruditapes philippinarum* es más resistente al estrés físico ambiental (FAO, 2005) y su respuesta ante bacterias es más rápida (Moreira y col., 2012) la convierten en un organismo idóneo para este fin.



Figura 2. Ejemplar de *Ruditapes philippinarum*. Mercado Municipal de Cádiz-2005. (Fuente: A. M. Arias, *Ictiolum*, 2005).

Morfológicamente ambas especies son similares, diferenciándose en la concha y en los sifones. Son infaunales y epibentónicas (puedan vivir tanto en el interior del sedimentos como en su superficie) lo que condiciona su modo de alimentación y las características de la dieta natural. Su posición en la cadena trófica marina, hace que sean un punto unión entre los productores primarios, otros invertebrados y depredadores superiores. Ambas especies se encuentran entre los bivalvos más explotados del mundo, adquiriendo una considerable importancia económica tanto en términos de acuicultura como fuente de recurso natural (FAO, 1996; Usero y col., 1997; Hamza- Chaffai y col., 1999; Donaghy y col., 2009). Sus hábitats y requerimientos son similares, no solamente compiten en la producción acuícola, sino también en los hábitats naturales (Usero y col., 1997). Aunque se ha descrito ya la sustitución de *Ruditapes decussatus* por *Ruditapes philipinarum* en diferentes ecosistemas (Gosling, 2003). Las zonas naturales donde se localizan, los estuarios, son consideradas como entornos biológicos de alto riesgo, por ser áreas ambientalmente sensibles a la contaminación y a la alteración de variables físicas como la Tª, salinidad, pH y oxígeno disuelto. Estos organismos bentónicos habitan en sedimentos de estuario/marinos que durante el siglo XX el incremento de la actividad humana, ocasionada por la revolución industrial, ha causado una grave degradación en los mismos (Pennings y Bertness, 2001).

En los estuarios los niveles de toxicidad son consecuencia de una gran variedad productos químicos procedentes de las actividades industriales, urbanas, agrícolas y marítimas que provocan que sus efectos se puedan acumular. También el amplio desarrollo costero ha ocasionado su fragmentación causando la interrupción del patrón de circulación natural. Estos hechos hacen que los estuarios sean cada vez más inadecuados para la fauna y flora.

La evaluación del riesgo ambiental en estas zonas, y más concretamente el análisis del riesgo, se realiza a partir de ensayos de toxicidad o bioensayos, que ante diferentes fuentes de estrés

ambiental, proporcionan información sobre la biodisponibilidad, efectos adversos y relación dosis-respuesta. Los bioensayos posibilitan la detección de respuestas biológicas a distintos niveles de organización (desde nivel molecular hasta nivel de comunidad) originadas por la exposición de un organismo a un determinado contaminante o una combinación de varios, permitiendo evaluar la biodisponibilidad de los mismos y su potencial tóxico.

*Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philipinarum* han sido utilizadas en bioensayos como especies bioindicadores en distintas fases de su ciclo de vida, desde estadio larvario (Beira y col., 2004; Toba y col., 2008), juvenil (Casado-Martínez y col., 2006) hasta adulto (Munari y col., 2011; Maranhão y col., 2015), con el fin de desarrollar una herramienta idónea que garantice el análisis del riesgo ambiental en los ecosistemas costeros y de transición, estuarios.

A pesar de los esfuerzos para limitar la cantidad de vertido a las aguas costeras y transición a través de la convención OSPAR (Oslo and Paris Conventions) o la WFD (Water Framework Directive), estos inputs siguen deteriorando la calidad de los ecosistemas marinos, potenciando la necesidad de desarrollar herramientas toxicológicas que permitan entender cómo los organismos interactúan con los contaminantes en su medio natural y determinar los riesgos sanitarios, ambientales y humanos posibles (Rodríguez y Pardal, 2014).

Como se ha descrito anteriormente, no solo la contaminación antropogénica constituye una fuente de estrés ambiental en ecosistemas de estuario, costeros y marinos sino también, la intensificación y el aumento de la frecuencia de episodios extremos climáticos. El cambio climático representa una especial amenaza para especies nativas de estuario, como *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philipinarum*, debido a que su capacidad de dispersión hacia zonas más favorables se verá limitada (Harley y col., 2006). El calentamiento global además de afectar a la temperatura del agua, origina cambios en el rango de las variables físicas claves (pH, T<sup>a</sup>, salinidad, oxígeno disuelto etc.) (Harley y col., 2006). Por ejemplo, el aumento de las temperaturas puede modificar indirectamente la salinidad del medio natural al incrementarse la frecuencia y la severidad de las tormentas, por la fusión de los casquetes polares y el aumento del nivel del mar, mediante la alteración de la circulación termohalina y el aumento de evaporación. En este sentido se manifiesta que el destino de las comunidades en el estuario puede depender de la capacidad de los organismos de tolerar y adaptarse a esta combinación de factores físico-químicos, de estrés biótico y a la disminución en la disponibilidad de hábitat.

Por tanto, se hace necesario un análisis crítico sobre la investigación realizada con especies bioindicadoras tales como *Ruditapes sp.*, utilizadas en las últimas décadas en procesos de ERA, con el objeto de estudiar su idoneidad a la hora de afrontar nuevos retos en lo que se refiere a nuevos contaminantes antropogénicos (contaminantes emergentes) y otras fuentes de estrés ambiental en el

marco del cambio global. Por esta razón se considera importante profundizar en el uso de *Ruditapes* *sp* para la evaluación del riesgo ambiental en sistemas litorales y marinos.

## **2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN**

### **2.1. Hipótesis de partida y objetivos**

La hipótesis de partida de este trabajo de fin de grado considera que el género molusco bivalvo *Ruditapes* es una especie bioindicadora apropiada para la evaluación del riesgo ambiental de ecosistemas marinos expuestos a estrés de origen antropogénico y natural, así como una especie adecuada para la ERA de nuevas fuentes de estrés para el ecosistema. La realización de un procedimiento de estudio que abarque los aspectos que determinan la evaluación del riesgo ambiental (nivel y naturaleza de la contaminación, biodisponibilidad de los contaminantes, mecanismos de toxicidad) y que incluye líneas de evidencia como el análisis de biomarcadores y el desarrollo de bioensayos mejora la eficacia de aplicación de la ERA utilizando esta especie como bioindicadora.

El objetivo fundamental de esta revisión bibliográfica es el análisis de las principales fuentes de estrés ambiental cuyo riesgo ha sido evaluado utilizando como especies bioindicadoras *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*, con el fin de proporcionar una visión global e integrada sobre la idoneidad del género molusco bivalvo.

La realización de este objetivo general implica la consecución de los siguientes objetivos concretos:

1. Análisis de las características de aclimatación de los organismos objeto de estudio.
2. Determinación de las respuestas agudas y crónicas medidas en *Ruditapes* *sp* tras la exposición a diferentes fuentes de estrés ambiental.
3. Estudio de las diferentes vías de exposición en laboratorio y campo.
4. Reflexión crítica de las mejoras e incertidumbres que definen la idoneidad de *Ruditapes* *sp* como especie bioindicadora.

### **2.2. Justificación de la revisión bibliográfica**

Los sistemas marinos, en especial los costeros y de transición, están sometidos a grandes presiones antrópicas. El desarrollo económico y la elevada densidad poblacional han potenciado un marcado deterioro de los ecosistemas marinos, costeros y de estuario a causa de la contaminación por vertidos de aguas residuales, mineros e hidrocarburos, por escorrentía de terrenos urbanos, industriales y agrícolas y por deposición de contaminantes atmosféricos y de dragado. Sin embargo,

en la actualidad, el progresivo crecimiento de las actividades humanas está modificando la dirección del cambio climático producido por causas naturales. Por consiguiente, gran parte de los contaminantes antropogénicos como es el caso de los metales, contaminantes emergentes y orgánicos como PAHs, PCBs y OCPs (pesticidas organoclorados), y de las alteraciones ambientales provocadas principalmente por la presencia humana, van a afectar a la fauna asociada a los sedimentos como a los fondos marinos en general (Reitzel y col., 2008). *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum* son especies epibentónicas e infaunales que viven sobre la superficie del sedimento, de forma que las variaciones físico-químicas del entorno van a originar que estas especies se vean involucradas en desarrollar nuevos mecanismos de adaptación ante la nueva situación. Por otro lado cabe mencionar la gran transcendencia que tiene el hecho de que los contaminantes incorporados en el sedimento entren en la cadena trófica al ser ingeridos por estos organismos bentónicos facilitando su paso y acumulación gradual en niveles tróficos superiores, por tanto, los perjuicios que las variaciones climáticas y que dicha contaminación producen pueden llegar a afectar a las personas, no sólo a su nivel económico sino también a nivel de salud. La investigación realizada hasta la fecha ha mostrado evidencias del importante papel que juegan las especies de invertebrados acuáticos en la evaluación del impacto de contaminantes en el medio ambiente (Ji y col., 2006; Martín-Díaz y col., 2008a; Morales-Caselles y col., 2008b; Aguirre-Martínez y col., 2015). Debido a esto, es importante de algún modo realizar una revisión bibliográfica que permita dar una visión global e integrada sobre la idoneidad del género molusco bivalvo *Ruditapes* agrupándose toda la información relevante relacionada con la aclimatación, las características de los bioensayos y las respuestas ante la exposición de contaminantes a fin de poder optimizar la evaluación de la contaminación antropogénica y de eventos climáticos de corta duración. Esto podría constituir un documento de ayuda en los procesos de ERA y la toma de decisiones relacionadas con la modificación o mejora del marco regulador del análisis del riesgo ambiental de vertidos antropogénicos (Ley del Estado Español 41/2010).

### **3. METODOLOGÍA.**

#### **3.1. Procedimiento de búsqueda y clasificación de la información**

La metodología empleada para la realización del presente trabajo de fin de grado se ha fundamentado en la búsqueda de artículos científicos principalmente. Para la localización de los documentos bibliográficos se utilizaron varias bases de datos: ScienceDirect, Scopus, Web of

Science y Pubmed, seleccionando únicamente aquellos artículos que informasen sobre los diferentes aspectos que debe contener el trabajo.

La búsqueda empleada fue simple y avanzada. En la búsqueda simple, se introdujeron las palabras clave en una única ventana obteniendo todos los documentos que contenían dicha palabra clave en el título o en el resumen del artículo. Para la búsqueda avanzada, era necesario conocer uno o más términos de campos específicos, como autor, título del artículo, título de la revista, año de publicación, etc.

Para comenzar una búsqueda resulta útil empezar introduciendo las palabras clave en un buscador general. Las palabras clave utilizadas en la realización de la búsqueda bibliográfica deben estar consensuadas por la comunidad científica, además de ser altamente significativas a la hora de obtener resultados. De este modo, cuánto más general sea la palabra sobre el tema a buscar el número de resultados obtenidos aumenta, en cambio, si la palabra es más específica menores resultados se conseguirán ya que estos se centrarán mucho en la temática a buscar, originando que el cribado a realizar sea menor. Por lo tanto, en esta revisión bibliográfica la palabra clave principal fue *Ruditapes sp.*

Con el objetivo de dar una visión global de los efectos e importancia de las fuentes de estrés ambiental se realizó una descripción de la fuente de estrés de mayor relevancia ambiental, quedándose justificada su empleo en la elaboración del presente trabajo de fin de grado.

Las fuentes de estrés seleccionados a la hora de realizar la búsqueda bibliográfica fueron:

1. Contaminantes antropogénicos: metales, PAHs, PCBs, pesticidas, fármacos, productos de cuidado personal, detergentes, dioxinas, TBTs y disruptores endocrinos;
2. Cambios en variables físico químicas: Tª, acidificación y eutrofización;
3. Vertidos: material de dragado, fuel, mineros y efluentes de agua residual.

Los **metales** son elementos que las investigaciones realizadas hasta la fecha (Hamza-Chaffai y col., 2000; Baudrimont y col., 2005; Chora y col., 2009; Moschino y col., 2012; Caro y col., 2015) señalan que tienen un alto potencial de bioacumulación y mortalidad.

Los **PAHs** o **hidrocarburos policíclicos aromáticos** constituyen una clase de contaminantes químicos muchos de los cuales son conocidos por ejercer efectos mutagénicos (Swartz y col., 1990; Canova y col., 1998; Pérez-Cadahía y col., 2004). Los PAHs, además, son una clase particular de contaminantes en el sentido de que la mayor parte de su toxicidad se deriva de la propios mecanismos de desintoxicación de las células (Martins y col., 2013).

Los **PCBs** o **bifenilos policlorados** son contaminantes ampliamente utilizados por una gran variedad de industrias en los últimos 50 años (McManus y col., 1983). Estos compuestos son secuestrados de manera eficiente en los tejidos ricos en lípidos de los organismos acuáticos

(Addison, 1982; Kawai y *col.*, 1988). En los bivalvos, más allá de las condiciones ambientales y las fluctuaciones estacionales de los lípidos, el tamaño es también un factor importante que influye en la acumulación de PCBs (Phillips, 1980).

Los **pesticidas organoclorados** u **OCPs** son el nombre común de un grupo de pesticidas que consisten en benceno y cloro, que han sido de gran preocupación debido a su elevada producción y uso. Algunos OCPs pertenecen a los contaminantes orgánicos persistentes (POPs) que son semi-volátiles, persistentes ambientalmente y tóxicos. Los POPs muestran un alto potencial de bioacumulación en los organismos y a largo plazo causan efectos negativos en los ecosistemas y la salud humana (Doong y *col.*, 2002; Vallack y *col.*, 1998; Jones y de Voogt, 1999).

Los **fármacos y los productos de cuidados personal (PPCPs)** son una gran grupo de sustancias usadas por los seres humanos para la mejora de la salud y la estética, además la agroindustria lo está empezando a utilizar para el incremento del crecimiento del ganado y la mejora de su salud. En particular los productos farmacéuticos son una clase de contaminante ambiental emergente actual empleado ampliamente en la medicina humana y animal (Daughton y Ternes, 1999; Fent y *col.*, 2006). Entre los diversos efectos de estas sustancias se encuentran la mortalidad, modificaciones en el sistema oxidativo celular, daños en el material genético y la bioacumulación (Matozzo y *col.*, 2012; Antunes y *col.*, 2013; Maranhão y *col.*, 2015).

Los **tensioactivos** son un grupo de compuestos químicos orgánicos con amplio uso en la limpieza, siendo muy importante su aplicación en detergentes de uso doméstico. Estos compuestos provocan la mortalidad (Servos y *col.*, 1999; Barbieri y *col.*, 2002), la bioacumulación y alteraciones de la actividad enzimática en los organismos (Saéz y *col.*, 2000; Álvarez-Muñoz y *col.*, 2006).

Las **dioxinas y furanos (PCDD/PCDF)** son dos familias de compuestos que agrupan un total de 5,020 variaciones pertenecientes a la llamada docena sucia de Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs), reconocidos en el convenio de Estocolmo (U.S. Environmental Protection Agency, Exposure Analysis and Risk Characterization Group, 1998). Los PCDD/PCDF son extremadamente estables, persistentes y bioacumulables en el medio ambiente (Boscolo y *col.*, 2007; Sfriso y *col.*, 2014).

Los **TBTs** o **tributilestano** es un biocida muy eficaz ampliamente empleado en todo el mundo como sustancia anti-incrustante en los cascos de los buques durante más de tres décadas, ha demostrado ser una de las sustancias más dañinas introducidas en el medio marino (Ritsema y Laane, 1991; Langston, 1995; Alzieu, 1996). Los efectos específicos de los TBTs son la inducción al cambio de sexo tanto en gasterópodos como en bivalvos y malformaciones en la concha y en los embriones de los bivalvos (Bryan y *col.*, 1986; Gibbs y Bryan, 1996; Coelho y *col.*, 2006; Inoue y

col., 2006). En general, se cree que el estrés añadido por estos contaminantes puede reducir el crecimiento de los animales y que para los bivalvos los juveniles son más sensibles que los adultos (Salazar y Salazar, 1987; Inoue, y col., 2007).

Los resultados obtenidos en la búsqueda quedan recogidos en la *Tabla 1* donde se muestran las palabras clave y las bases de datos empleadas, diferenciado los resultados de la búsqueda simple de los de la avanzada con paréntesis.

La presente revisión bibliográfica se ha realizado a partir de los artículos adquiridos en la búsqueda avanzada, debido a que este método es el que proporciona los resultados más directos y precisos relacionados con la temática a tratar.

A partir de la *Tabla 1* se aprecia que la base de datos que ofrece los mayores resultados cribados es Scopus, en oposición a Web of Science que es en la que menos resultados se obtienen. Sin embargo la base de datos Pubmed, con resultados intermedios, la información que muestra es más cercana al tema que se está buscando debido a que contiene el menor número de documentos de las cuatro bases sin cribar. Scopus a pesar de ser la base con la mayor cantidad de información, el cribado a realizar es bastante exhaustivo, para compensarlo, la página web cuenta con varias herramientas y diferentes opciones que facilitan la realización del cribado de los resultados.

Por otra parte, Web of Science con el menor número de resultados cribados, es una de las mejores para la realización de la búsqueda, puesto que los resultados obtenidos se aproximan mucho a la temática tratada y el cribado a realizar es mínimo. Los disruptores endocrinos fueron el único contaminante que no se consideró a causa de que los artículos recopilados no eran específicos del objetivo del presente trabajo, siendo el mismo caso que el impacto de la radiación ultravioleta. El idioma utilizado en las palabras clave fue el inglés, a causa de que la gran mayoría de la literatura científica relacionada con la temática de la presente revisión bibliográfica está en este idioma. En el procedimiento de selección de los artículos aquellos que se han elegido se ha revisado el título, el resumen, la metodología y los resultados de cada uno de los documentos. Para abordar el estudio de la aclimatación del género *Ruditapes* a condiciones de laboratorio las variables elegidas a buscar en la documentación para caracterizar esta adaptación fueron: temperatura (°C), salinidad, fotoperiodo, origen del agua de mar (natural, natural filtrada o artificial), tipo de alimentación y procedencia de la captura (acuicultura o natural). La descripción de la experimentación se realizó dividiendo los experimentos en función de su lugar de realización (campo o laboratorio).

Tabla 1. Resultados obtenidos en la búsqueda simple y avanzada en las diferentes bases de datos. La búsqueda simple se indica con paréntesis.

Palabras clave/ Bases de datos	Science Direct	Web of Science	Scopus	Pubmed
<i>Ruditapes</i> and metals	(1453) 57	(366) 35	(2232) 172	(117) 50
<i>Ruditapes</i> and PAH <sub>s</sub>	(308) 12	(40) 1	(300) 20	(10) 10
<i>Ruditapes</i> and PCB <sub>s</sub>	(273) 3	(21) 1	(255) 17	(4) 4
<i>Ruditapes</i> and pesticides	(589) 8	(32) 5	(724) 19	(22) 8
<i>Ruditapes</i> and pharmaceuticals	(224) 4	(13) 0	(342) 10	(3) 3
<i>Ruditapes</i> and personal care products	(90) 1	(5) 0	(56) 1	(1) 1
<i>Ruditapes</i> and detergents/ surfactants	(121) 2	(1) 0	(59) 1	(3) 2
<i>Ruditapes</i> and dioxins	(184) 0	(4) 0	(201) 6	(0) 0
<i>Ruditapes</i> and TBTs	(253) 12	(31) 6	(328) 19	(11) 11
<i>Ruditapes</i> and endocrine disrupter	(61) 1	(2) 1	(82) 1	(0) 0
<i>Ruditapes</i> and temperature	(2412) 43	(285) 24	(2338) 148	(24) 22
<i>Ruditapes</i> and acidification	(153) 2	(18) 3	(162) 9	(3) 3
<i>Ruditapes</i> and ultraviolet radiation	(51) 0	(3) 2	(59) 0	(0) 0
<i>Ruditapes</i> and eutrophication	(274) 4	(12) 1	(314) 13	(7) 1

\* Continúa en la siguiente página



<b>Palabras clave/</b>				
<b>Bases de datos</b>	<b>Science Direct</b>	<b>Web of Science</b>	<b>Scopus</b>	<b>Pubmed</b>
<b><i>Ruditapes</i> and effluents</b>	(1) 0	(24) 4	(0) 0	(0) 0
<b><i>Ruditapes</i> and oil spill</b>	(234) 1	(25) 2	(290) 5	(2) 2
<b><i>Ruditapes</i> and dredged material</b>	(131) 3	(7) 1	(127) 6	(1) 1
<b><i>Ruditapes</i> and mining spill</b>	(84) 0	(12) 1	(102) 5	(3) 3

Los resultados obtenidos se agruparon dependiendo del tipo de respuesta y monitorización que se utilizaba en cada estudio para analizar la biodisponibilidad y efectos adversos de las diferentes fuentes de estrés ambiental (ver anexo: tablas de respuestas).

En la *Tabla 2* se agrupan las diferentes respuestas seleccionadas para el análisis de la biodisponibilidad y los efectos adversos que la exposición a contaminantes de origen antropogénico provoca en dichas especies bentónicas.

Por último los datos de temperatura, salinidad, origen del agua de mar, procedencia de la captura, impactos ambientales, fuentes de contaminación, tipo de experimento y biomarcadores fueron expresados como porcentajes respecto del número total de artículos en los que aparece cada una de las variables anteriores (ver anexo: tablas de aclimatación y tablas de respuestas).

### **3.2. Análisis estadístico**

Los datos fueron estadísticamente analizados de forma descriptiva usando el software libre estadístico R-Studio (versión 0.98.953) a partir del cual se representaron mediante diagramas de sectores (ver anexo: código R).

Tabla 2. Biomarcadores a distintos niveles de organización biológica estudiados en *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*.

Nivel de organización		Biomarcadores/ Bioacumulación
Sub-individuo	Bioquímico	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Actividades de enzimas antioxidantes</li> <li>- Peroxidación lipídica</li> <li>- Daño ADN</li> <li>- Actividades de enzimas de detoxificación</li> </ul>
	Celular	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alteración de la estructura de la membrana</li> <li>- Alteración de la morfología celular</li> </ul>
	Histológico	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución del tamaño celular</li> <li>- Aumento del tamaño celular</li> <li>- Aumento del número de células</li> <li>- Infiltración de hemocitos</li> </ul>
Individuo	Fisiológico	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anomalías en el crecimiento</li> <li>- Disminución de la capacidad reproductiva</li> <li>- Disrupción endocrina</li> <li>- Acumulación de sustancias</li> </ul>
	Conductual	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Motricidad: capacidad natatoria, distancia recorrida</li> <li>- Reducción tasa de enterramiento</li> </ul>
	Mortalidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Supervivencia /mortalidad</li> </ul>

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se comentan y se discuten los resultados obtenidos en la revisión bibliográfica, en la que se intenta dar una visión global sobre las características de la aclimatación y las respuestas agudas y crónicas medidas en los organismos expuestos a diferentes agentes estresantes. Para finalizar el presente apartado se realiza un análisis crítico sobre las mejoras e incertidumbres que definen la idoneidad de *Ruditapes sp* como especie bioindicadora y una descripción de nuevas fuentes de contaminación.

#### 4.1 Aclimatación

La Asociación Española de Toxicología define la aclimatación como aquellos procesos que incluyen selección y/o adaptación, por el cual una población o un individuo desarrollan tolerancia a un cambio ambiental o a una sustancia, o adquiere capacidad para degradarla. A partir de los resultados obtenidos, antes del comienzo de los ensayos de toxicidad se recomienda una aclimatación en un acuario de temperatura constante (15-20 °C) con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad o 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante un intervalo de 1-7 días (*Figura 3*). Los estudios realizados a una temperatura superior a 10 °C dan a entender la existencia de ciertos inconvenientes no especificados para períodos de aclimatación superior a 28 días (Li y col., 2002; Coelho y col., 2006). Las observaciones de los investigadores identificaron que el desarrollo sexual en el agua de mar comienza cuando la temperatura del agua sobrepasa los 10 °C, por tanto en el criadero se puede acelerar la madurez manteniendo las almejas a temperaturas elevadas, largos períodos de tiempo y proporcionándoles una ración alimenticia adecuada. Es posible estimular la madurez sexual de los adultos en invierno y a comienzos de la primavera, antes de que las almejas comiencen el desarrollo sexual, y de este modo se puede ampliar el período durante el cual los criaderos tienen acceso a las larvas. Así pues, durante la mayor parte del año puede haber almejas disponibles en estado de desove. Su dieta se basa fundamentalmente en diatomeas (*Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros neogracile*, *Thalassiosira pseudonana* y *Phaeodactylum*), clorofíceas (*Chlorella vulgaris beji*, *Tetraselmi chuii* y *Tetraselmis suecica*), haptofíceas (*Isochrysis galbana*) y cianofíceas (*Spirulina platensis*). Durante la aclimatación el stock de organismos deben mantenerse en sistemas de recirculación aireados compuestos principalmente por tanques (20 x 25 x 40 cm) y bombas de aireación (El-Shenawy y col., 2009). La vibración de los tanques tiene que ser reducida al mínimo mediante la instalación, por ejemplo, de piezas de poliestireno bajo los mismos. Además cada tanque debe estar lleno de agua natural procedente de una zona no contaminada o de agua artificial, con un intervalo de salinidad de 30-35 (*Figura 3*). Ciertos estudios científicos revisados informan de que se hace necesaria una filtración del agua de mar natural, a pesar de que no siempre se especifica el tamaño de diámetro de poro utilizado (Blasco y col., 1998; Fernández-Reiriz y col., 2011; Range y col., 2011). El agua de mar artificial se puede preparar utilizando una obtenida comercialmente, o por el contrario, a partir del uso de productos químicos reactivos de laboratorio. En cualquier caso siempre debe utilizarse el agua de alta calidad.

En la gran mayoría de los trabajos considerados en los que se realizan experimentos de campo con *Ruditapes sp.*, estos moluscos bivalvos son recolectados de la zona de muestreo (intermareal o submareal) a mano (Dellali y col., 2001; Moschino y col., 2012; Rodríguez-Romero y col., 2014).

Por el contrario, aquellos trabajos en los que se realizan experimentos en laboratorio los individuos de *Ruditapes sp* provienen del medio natural principalmente, aunque en la actualidad está cogiendo una mayor relevancia los organismos originarios de la acuicultura fomentándose de esta forma, una reducción del impacto ambiental negativo sobre el entorno natural.

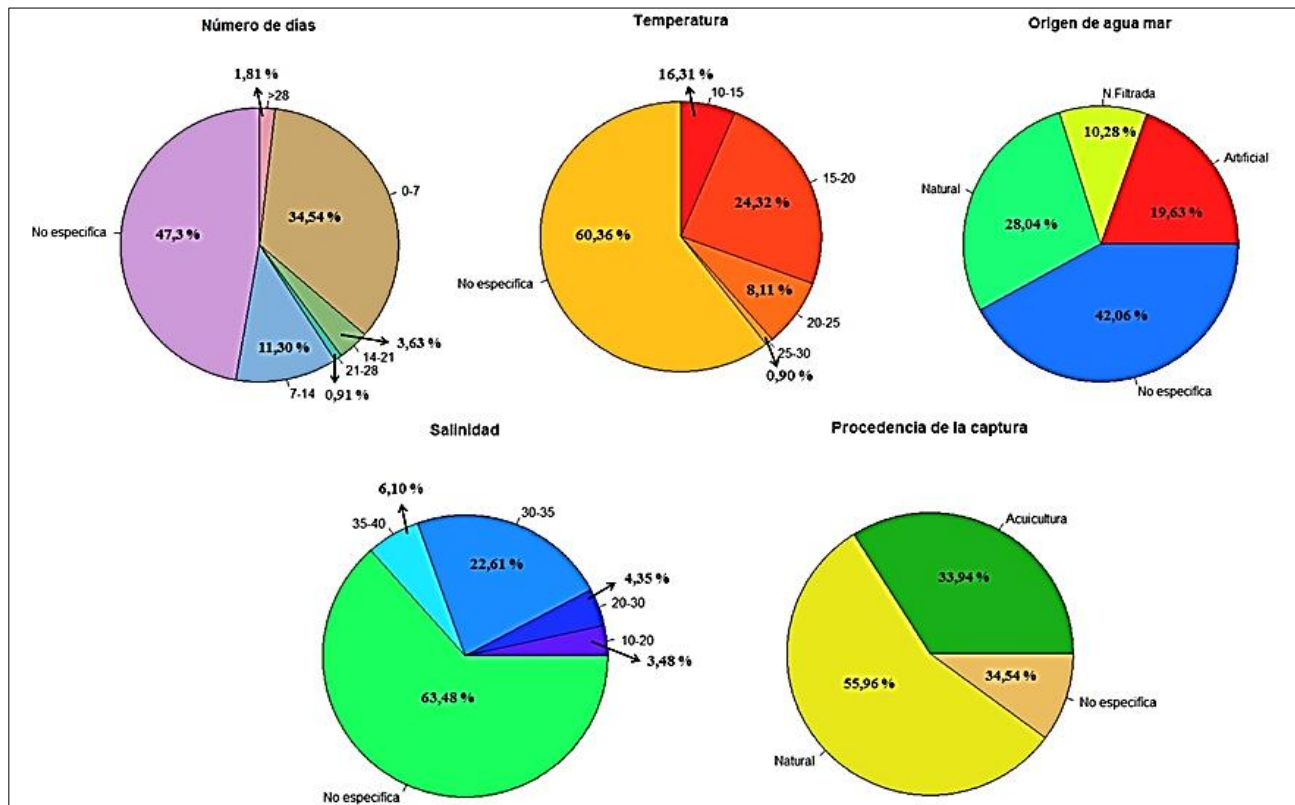


Figura 3. Valores en porcentaje de las variables (número de días, temperatura, origen de agua de mar, salinidad y procedencia de la captura) que definen la aclimatación de *Ruditapes sp*.

## 4.2. Ensayos de laboratorio y campo

Los ensayos de toxicidad son los bioensayos empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. Su aplicación se centra en el ámbito regulador (registro de nuevas sustancias o productos), en la vigilancia y control ambiental (monitorización de efluentes, vertidos mineros o petrolíferos) y en la investigación (profundizar en los mecanismos toxicológicos). En los bioensayos se usa tejido vivo, organismo, o grupo de organismos, como reactivo para evaluar los efectos de cualquier sustancia fisiológicamente activa. Estos ensayos consisten en la exposición de grupos de organismos a determinadas concentraciones de tóxico por un tiempo determinado. Los organismos utilizados deben presentar una alta disponibilidad durante todo el año, fácil mantenimiento, alta sensibilidad y una importancia económica / ecológica / biológica, además de existir información suficiente sobre su biología, genética, fisiología etc. El género molusco bivalvo *Ruditapes* es ampliamente usado por la comunidad científica en este tipo de experimentación por

cumplir los requisitos anteriores (Bebianno y col., 1993; Hamza-Chaffai y col., 1999; Ji y col., 2006; Paul-Pont y col., 2010).

Los organismos, asimismo, tienen que estar en buenas condiciones de salud, previamente aclimatados a las condiciones del ensayo, y se mantienen en condiciones ambientales constantes. Además se dispone de grupos de control (no expuestos al tóxico).

Posteriormente se miden y registran los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y tratados y, posteriormente, se efectúa un análisis estadístico de los datos obtenidos.

Las medidas de biodisponibilidad y efecto a través de los biomarcadores, así como la bioacumulación de contaminantes, evaluados en *Ruditapes* sp predominantes en la bibliografía analizada son: acumulación y daños en tejido biológico, alteraciones en la actividad de enzimas antioxidantes, daños en el ADN, cambios en el tamaño y forma celular, anomalías en el crecimiento somático y variaciones tanto en el desarrollo embrionario como en el sistema hormonal que provocan un cambio de sexo. También se determina mortalidad a partir de la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), que es la concentración letal para el 50 % de los individuos expuestos (Beiras y Albentosa, 2004; Riba y col., 2004; Thomas y Foster, 2004; Weigel y col., 2004; Gagné y col., 2006; Choi y col., 2011; Basallote y col., 2012; Moschino y col., 2012).

Los ensayos en los que se emplea el género molusco *Ruditapes* como organismo bioindicador pueden ser llevados a cabo en condiciones de laboratorio (con un número reducido de especies, y en condiciones estandarizadas que reproducen sólo en forma muy parcial las condiciones naturales en el ambiente) o *in situ* (con “encierros” sometidos a las condiciones del medio natural).

En los ensayos de laboratorio los organismos se exponen a diferentes fuentes de estrés ambiental dentro de acuarios con sistemas de aireación de flujo continuo. Los sistemas de bombeo de agua son controlados mediante bombas peristálticas (Blasco y Puppo, 1999) En esta clase de experimentos las almejas son suspendidas en el medio del acuario dentro de un vaso “caja”, con la base cubierta por una red, diseñada para reducir al mínimo la manipulación de los individuos, de esta forma la renovación del agua y la limpieza podrán llevarse a cabo sin la manipulación de las almejas (Coelho y col., 2006). Los replicados son usados (Blasco y Puppo, 1999; Serafim y col., 2010; Figueira y col., 2012; Maranhão y col., 2015). Los grupos son introducidos en tanques diferentes e independientes entre sí (Mariño-Balsa y col., 2003; Inoue y col., 2006; Inoue y col., 2007). Se suelen dividir a los organismos por grupos en función de su sexo, fase del ciclo vital y tamaño (Usero y col., 1997) cuando se estudian los efectos de la toxicidad en determinados periodos de la fase vital. Durante la experimentación el agua es renovada y las concentraciones de los tóxicos se re-estabilizan (Bebianno y Serafim, 1998; Chora y col., 2009; Serafim y col., 2010; Figueira y col., 2012). Los organismos son alimentados con mezclas de fitoplancton (Coelho y col., 2006; Inoue y

col., 2007; Martín-Díaz y col., 2008; Serafim y col., 2010; Zhang y col., 2012) excepto en aquellos experimentos cuyo objetivo es evaluar la variación morfológica y de crecimiento de los individuos cuando se exponen al contaminante (Li y col., 2002; Coelho y col., 2006; Toba y col., 2008). Este tipo de experimentación permite la comparación de especies de diferentes niveles tróficos y la posibilidad de utilizar especies más sensibles, sin embargo, esto origina una incapacidad de predecir efectos bajo condiciones de campo y solo pueden ser aplicables a especies probadas (DelValls y Conradi, 2000).

Para los ensayos de laboratorio existen protocolos estandarizados desarrollados por distintos organismos, cuyas ventajas son útiles para la monitorización de rutina, facilitan la comparación de resultados entre distintos laboratorios, etc. Estos protocolos son: APHA (American Public Health Association), EPA (Environmental Protection Agency), ASTM (American Society for Testing and Materials), ISO (International Standardization Organization) y OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Los protocolos de los métodos de ensayo de toxicidad legales en la UE se basan en las Directrices de la OECD. Esta disponibilidad de metodologías estandarizadas va a ocasionar una deficiencia del realismo (Del Valls y Conradi, 2000). En los ensayos de campo los organismos son expuestos a los sedimentos y a la columna de agua de forma natural o artificial. Si el ensayo se realiza de forma natural los organismos nativos son recolectados de la zona intermareal o submareal a mano (Dellali y col., 2001; Moschino y col., 2012; Rodríguez-Romero y col., 2014), por el contrario si se lleva a cabo de forma artificial se emplean jaulas bentónicas (Ramos-Gómez y col., 2011) o pelágicas sostenidas con un sistema de flotación (*Figura 4*). Estos tipos de ensayos son utilizados para estudios de seguimiento de vertidos antropogénicos (industriales, mineros, afluentes etc.) (Morales-Caselles y col., 2008a; Morales-Caselles y col., 2008b). Los duplicados son usados al igual que los ensayos en laboratorio (Ramos-Gómez y col., 2011; Zheng y col., 2012) Durante el transporte al laboratorio las almejas se colocan en neveras portátiles frías (Sacchi y col., 2013). El género molusco *Ruditapes* se caracteriza por ser bastante resistente a períodos de sequedad, esto proporciona a los investigadores un cierto margen para la movilidad de los individuos a las instalaciones de los laboratorios (MAGRAMA). Al estar las jaulas fabricadas con redes es necesario la limpieza de las mismas cada cierto tiempo con el fin de eliminar el sedimento, los macrófitos, los organismos incrustados y los depredadores que las recubre (Sfriso y col., 2014). Después del período de exposición, las almejas son cuidadosamente limpiadas del fango y mantenidas en agua autóctona del medio durante un intervalo de tiempo, autores como Sfriso y col. (2014) recomiendan que este intervalo sea de por lo menos 24 horas con la finalidad de limpiar el sedimento de las valvas y el aparato digestivo para reducir o evitar errores en los experimentos.



Figura 4 Jaula para estabulación de organismos (fotografía izquierda) y ensayos de toxicidad en laboratorio (fotografía derecha). Especie: *Ruditapes philippinarum*. (Fuente: Aguirre-Martínez, 2014. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz).

Los bioensayos in situ presentan una serie de ventajas respecto a los ensayos de toxicidad realizados en laboratorio. Frente a los ensayos de laboratorio, la utilización de animales en jaulas bentónicas muestra información sobre la toxicidad bajo condiciones naturales, no controladas, integrando el papel que desempeñan tanto los contaminantes presente en el medio natural como las variaciones físico-químicas del mismo, las cuales afectan a la biodisponibilidad de los contaminantes (Martín-Díaz, 2004), sin embargo, esto hace que los ensayos de campo muestren una incapacidad de aislar los factores causantes de estrés (Del Valls y Conradi, 2000). También, estos bioensayos posibilitan la identificación de fuentes de contaminación que quedan excluidas en los ensayos de laboratorio y que pueden dar lugar a alteraciones biológicas (Morales-Caselles, 2007) y por último, proporcionan evidencias del deterioro e indican los contaminantes responsables de la afectación (Del Valls y Conradi, 2000).

El género molusco bivalvo *Ruditapes* predomina su uso en los ensayos de laboratorio que en los realizados en campo, ya que en el 63,21 % de los artículos analizados este organismo es empleado en experimentos de laboratorio frente al 36,79 % de campo (Figura 5). Estos datos son indicativos de que *Ruditapes sp* parece ser más idóneo para bioensayos de laboratorio que de campo, obteniéndose en este tipo de experimentos resultados más óptimos y fiables. Entre las sustancias usadas en los ensayos, las que prevalecen en laboratorio son metales (44,30 %) seguido de TBTs (14,24 %), mientras que en campo siguen dominando los metales (32,62 %) seguidos de PAHs (21,74 %) (Figura 5). Estos bivalvos, como indican los resultados, presentan la ventaja de ser organismos bioindicadores para una amplia gama de sustancias lo que aumenta la posibilidad de realización de estudios en los que se pretende conseguir la integración del efecto de varios contaminantes, permitiendo adaptar el experimento de una forma más precisa y real a la naturaleza,

ya que se está analizando al mismo tiempo las interacciones de varios contaminantes con el entorno natural, situación muy similar a lo que ocurre realmente en el medio natural. De esta forma se recomienda la utilización de *Ruditapes sp* en aquellos trabajos de investigación que tengan como fin la evaluación riesgo ecológico mediante ensayos de toxicidad en laboratorio. Para finalizar, el hecho de que *Ruditapes sp* sea una especie epibentónica va permitir evaluar tanto la calidad del agua como la del sedimento, ya que al situarse en la interfase agua-sedimento van a filtrar los contaminantes que están biodisponibles tanto en el agua como en el sustrato. El hecho de que los organismos habiten en la interfase va a facilitar a los investigadores la posibilidad de estudiar y analizar el comportamiento y las respuestas de los contaminantes biodisponibles en dos compartimentos ambientales diferentes, realizando un estudio integrado de ambos.

#### **4.3. Ensayos de toxicidad agudos y crónicos. Bioacumulación.**

Los ensayos de ecotoxicidad aguda se usan para establecer una primera estimación de la toxicidad y evaluar si se necesita estudios posteriores. También se usan para monitorizar la toxicidad de los efluentes (Bebianno, 1995). Se diseñan para medir los efectos de los agentes tóxicos durante un período corto de la vida de los organismos expuestos ( $\leq 96$  h). Las respuestas observadas son: muerte (peces, moluscos), inmovilización (dafnias), cambios en la luminiscencia (bacterias luminiscentes), etc. Y los parámetro estimados son:  $CL_{50}$  (muerte), o  $CE_{50}$  (concentración de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos).

El objetivo de los ensayos de ecotoxicidad crónica es establecer las concentraciones ambientalmente seguras. Se diseñan para evaluar los posibles efectos adversos de las sustancias químicas bajo condiciones de exposición a largo plazo ( $> 10$  % ciclo vital) utilizando concentraciones subletales.

Las respuestas observadas en los ensayos de ecotoxicidad crónica (principalmente subletales, biomarcadores) son: alteraciones en el crecimiento (Ji y col., 2006), reproducción (Inoue y col., 2006) comportamiento (Rodríguez-Romero y col., 2014), parámetros fisiológicos y bioquímicos (Liu y col., 2010; Zhang y col., 2011). Los parámetros estimados son: NOEC (concentración sin efecto observable), LOEC (concentración mínima de efecto observable) y MATC (concentración tóxica máxima aceptable).



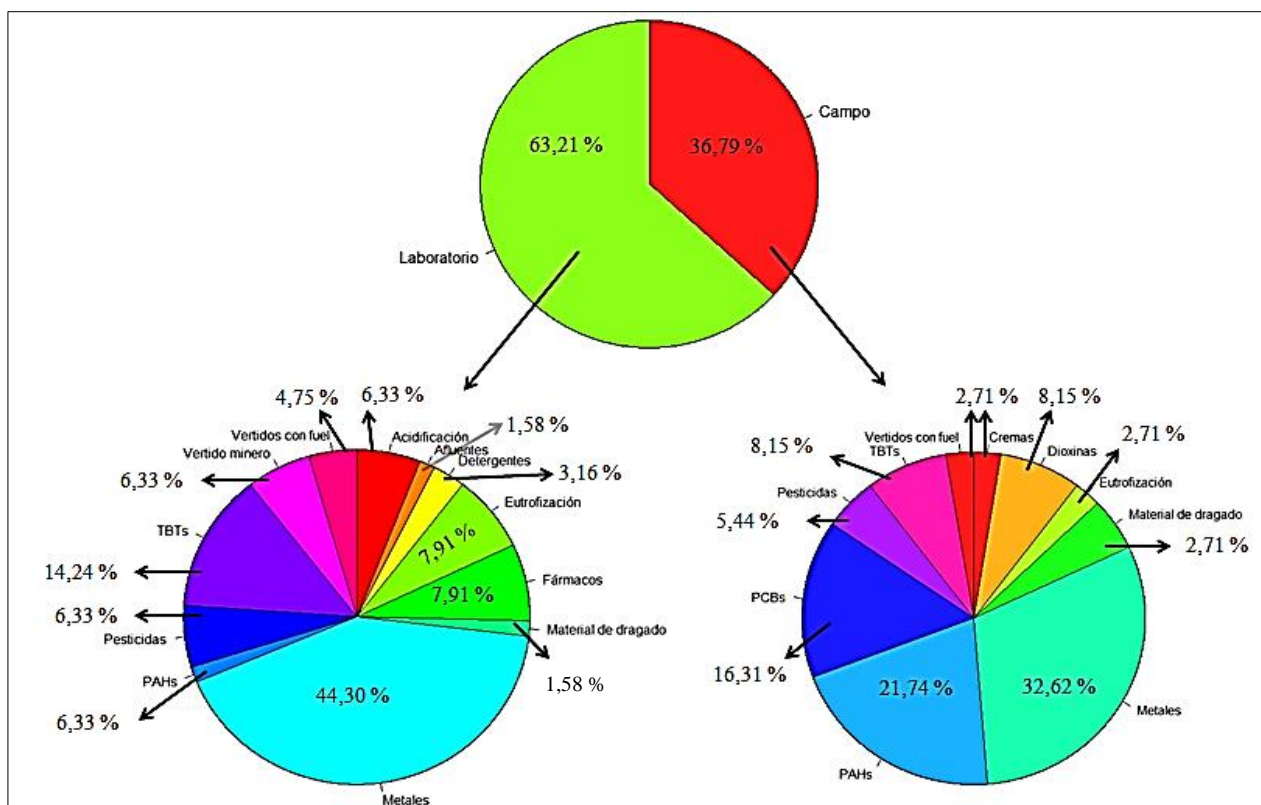


Figura 5. Valores en porcentaje del empleo de *Ruditapes sp* en ensayos de laboratorio y campo, con los respectivos porcentajes de las sustancias utilizadas en ambos ensayos.

*Ruditapes sp* se ha utilizado en ensayos que han sido los protocolos estandarizados como los ASTM. Autores como Fathallah y col. (2011) emplearon a *Ruditapes decussatus* como organismo bioindicador para evaluar los efectos de la contaminación en su fase embrionaria en la costa de Túnez mediante un ensayo de toxicidad aguda basado en el protocolo ASTM (1998). En cambio, Yang y col. (2013) obtuvieron valores de bioacumulación de metales traza (Cu, Zn, Pb, Hg y As) en *Ruditapes philippinarum* con el propósito de estimar el riesgo de los vertidos de la acuicultura para la salud humana. Valores que compararon con los estándares de bioacumulación en moluscos bivalvos determinados por la USEPA.

La medición de las respuestas de los individuos (biomarcadores) a los contaminantes permite el establecimiento de las relaciones dosis-respuesta, que forman la base de las pruebas de toxicidad. Sin embargo, en ecotoxicología acuática, la dosis a menudo se sustituye por la concentración debido a la dificultad de administrar dosis orales o inyectables. La dosis o las relaciones de concentración-respuesta se pueden obtener a partir de estudios de laboratorio y / o en el campo (Rodríguez y Pardal, 2014).

Cuando hablamos de contaminantes como fuentes de estrés ambiental, éstos si están biodisponibles, penetran en las almejas desde el agua, el sedimento o el alimento por medio de las

branquias y se acumulan principalmente en la glándula digestiva vía hemolinfa (Martín-Díaz y *col.*, 2008). El sistema digestivo de los moluscos bivalvos desempeña muchas funciones asociadas con los vertebrados, tales como la absorción y el transporte de partículas alimentarias, la secreción de enzimas hidrolíticas o digestivas que catalizan la degradación de moléculas de gran tamaño para formar fragmentos más pequeños mediante unas reacciones que se conocen con el nombre de reacciones hidrolíticas y el almacenamiento de lípidos, glucógeno y minerales (Hill y *col.*, 2004). Una vez que el contaminante se encuentra en el interior del organismo se desencadena el proceso llamado biotransformación.

La biotransformación puede definirse como una conversión catalizada por enzimas de compuestos xenobióticos (origen artificial) en una forma soluble en agua que es más fácilmente excretada por el organismo que el compuesto original (Lech y Vodick, 1985). Las enzimas implicadas en el biotransformación de xenobióticos se caracterizan por tener un grado de especificidad relativamente bajo (Melancon y *col.*, 1992). Esta etapa tiende a convertir el compuesto lipofílico en una especie más polar e hidrofílica que puede secretarse por ejemplo por la orina o la bilis.

La toxicidad del compuesto puede verse afectada por el metabolismo, el cual puede ser beneficioso (reacciones de detoxificación) o perjudicial (bioactivación). Los organismos contienen un número de sistemas enzimáticos capaces de biotransformar compuestos xenobióticos para transformarlos en otros más hidrosolubles, que sean más fácilmente excretables. Además, las biotransformaciones pueden inducir considerables cambios en la actividad biológica de los xenobióticos. Si esta actividad decrece, el proceso se denomina detoxificación, y si aumenta se denomina bioactivación.

Por tanto, los compuestos xenobióticos son transformados siguiendo una ruta la cual se subdivide en dos fases: fase I y II. En la fase I tiene lugar la oxidación, reducción o hidrólisis del compuesto original, que luego se conjuga y se cataboliza en la fase II (Commandeur y *col.*, 1995). Muchos contaminantes ambientales (o sus metabolitos) han demostrado ejercer efectos tóxicos relacionados con el estrés oxidativo (Winston y Di Giulio, 1991; Morales-Caselles y *col.*, 2007; Morales-Caselles y *col.*, 2008a; Antunes y *col.*, 2013; Maranhão y *col.*, 2015). Los sistemas de defensa del organismo han evolucionado para combatir la formación de radicales libres, procedentes de las reacciones de detoxificación, utilizando enzimas antioxidantes. Diversos estudios han demostrado la inducción de estas enzimas antioxidantes por aumento de contaminantes que generan radicales libres (Winston y Di Giulio, 1991; Morales-Caselles y *col.*, 2007; Morales-Caselles y *col.*, 2008a; Antunes y *col.*, 2013; Maranhão y *col.*, 2015).

#### 4.3.1. Toxicidad aguda: CE<sub>50</sub> o CL<sub>50</sub>

La toxicidad aguda es aquella en la que los efectos adversos aparecen rápidamente tras una exposición o una dosis única suficientemente alta. En el laboratorio, la toxicidad se mide generalmente mediante pruebas estandarizadas de corto plazo (e.j., OECD 2003) con la mortalidad, la inmovilidad o inhibición del crecimiento como puntos finales. Estos estudios permiten obtener información cuantitativa para el establecimiento de datos eco toxicológico expresados como concentración efectiva media o letal (CE<sub>50</sub> o CL<sub>50</sub>).

Sin embargo, la literatura actual sobre *Ruditapes sp* muestra que los datos de CL<sub>50</sub> son escasos, obtenidos como resultado de la exposición de las especies a distintas variables físico-químicas (pH y salinidad) y sustancias (metales y pesticidas) en su fase larvaria y adulta (*Tablas 3, 4, 5 y 6*). Únicamente se encontraron valores en cinco artículos diferentes. En cuanto a los datos de CL<sub>50</sub> de toxicidad a corto plazo, la presente revisión presenta valores de 9 sustancias químicas diferentes, 5 de metales y 4 de pesticidas (*Tablas 5 y 6*). En el caso del pH la CL<sub>50</sub> se expresó de dos modos diferentes, por un lado como porcentaje que causa el 50 % de la mortalidad de los individuos expuesto a un pH específico y por otro lado como concentración de protones que origina la muerte del 50 % de los organismos (*Tabla 3*). La salinidad al igual que el pH, la CL<sub>50</sub> también se expresó como porcentaje (*Tabla 4*). Los valores del tiempo letal medio (LT<sub>50</sub>) para el As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn también son presentados en la *Tabla 7*, ya que estos metales trazas fueron utilizados por Moschino y col. (2012) en su estudio, determinando el LT<sub>50</sub> en diferentes zonas de muestreo a partir del método de Kaplan y Meier (1958). Los valores de LT<sub>50</sub> obtenidos para *Ruditapes sp*, son superiores a los registrados por la literatura para otros organismos bioindicadores como *Carcinus maenas* (Rodrigues y Pardal, 2014), *Limnoperna fortunei* (Darrigan y Damborenea, 2001) y *Pernas viridis* (Acosta y Lodeiros, 2001), lo cual indica la baja sensibilidad de estos moluscos bivalvos cuando se evalúa la mortalidad como criterio de valoración.

Tabla 3. Valores de  $CL_{50}$  y  $L[H]_{50}$  para *Ruditapes* sp a diferentes pH.

pH	Concentración: $CL_{50}$ (%)	$L[H]_{50}$ (mol/kg)	Referencia
7,5	2,38	-	Riba y col. (2004)a
6,5	0,36	-	Riba y col. (2004)a
6,26	-	$5 \times 10^{-7}$	Basallote y col. (2012)

Tabla 4. Valores de salinidad y  $CL_{50}$  (%) para *Ruditapes* sp.

Salinidad	Fase del organismo	Concentración: $CL_{50}$ (%)	Referencia
35	Adultos	4,32	Riba y col., (2004)a
20	Adultos	2,98	Riba y col., (2004)a
10	Adultos	0,71	Riba y col., (2004)a

Tabla 5. Valores de  $CL_{50}$  para *Ruditapes* sp a diferentes metales.

Químico	Fase del organismo	Concentración: $CL_{50}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	Referencia
Hg	Larva	4,2	Beiras y col., (2004)
Cu	Larva	9,1	Beiras y col., (2004)
Zn	Larva	129	Beiras y col., (2004)
Cd	Larva	424	Beiras y col., (2004)
Pb	Larva	156	Beiras y col., (2004)

Tabla 6. Valores de  $CL_{50}$  para *Ruditapes* sp a diferentes pesticidas.

Químico	Fase del organismo	Concentración: $CL_{50}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	Referencia
Methidation	Adultos	7,16	Choi y col., (2011)
Chlorpyrifos	Adultos	340	Choi y col., (2011)
Diazinon	Adultos	3010	Choi y col., (2011)
IBP	Adultos	3410	Choi y col., (2011)

Tabla 7. Valores de  $LT_{50}$  para *Ruditapes* sp.

Fase del organismo	Tiempo: $LT_{50}$ (días)	Referencia
Adultos	4	Moschino y col., (2012)
Adultos	5	Moschino y col., (2012)
Adultos	6	Moschino y col., (2012)
Adultos	7	Moschino y col., (2012)

#### 4.3.2. Toxicidad crónica

La toxicidad crónica es aquella en la que los efectos adversos aparecen tras una exposición prolongada. Entre los efectos subletales que se miden en los ensayos de toxicidad crónica, se encuentran los llamados biomarcadores, cambios medibles que tienen lugar en diferentes

parámetros a distintos niveles de organización biológica que van disminuyendo la salud del individuo. Existen biomarcadores que de una forma más o menos específica indican la presencia de contaminantes en el medio (biomarcadores de exposición), mientras que otros reproducen daños de la contaminación o son precursores de éstos (biomarcadores de efecto). Su análisis facilitan el establecimiento de mecanismos de toxicidad (Ramos-Gómez, 2011). Es posible analizar el impacto de los agentes estresantes en las almejas con varios tipos de biomarcadores, los utilizados en este estudio se detallan a continuación (*Figura 5*):

Enzimas de biotransformación: En general, los biomarcadores de efecto más sensibles son las alteraciones en los niveles y actividades de las enzimas de biotransformación (Van der Oost y *col.*, 2003). En almejas, la actividad de estas enzimas puede ser inducida o inhibida tras la exposición a contaminantes (Bebianno y Barreira, 2009), como metales, fármacos y PAHs. La inducción enzimática es un aumento en la cantidad o actividad de estas enzimas, o ambos. La inducción de la actividad del citocromo P450 fue observada como consecuencia de la exposición a carbamazepina (fármaco anti compulsivo y estabilizador del estado de ánimo) (Almeida y *col.*, 2014) y a metales (Zhang y *col.*, 2012). La etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD) es una enzima que se activa como consecuencia de la inducción del citocromo P450, es por esto por lo que se utiliza como biomarcador. Dicho biomarcador se activa en presencia de materiales de dragado, fuel, pesticidas y metales (Martín-Díaz y *col.*, 2008; Morales-Caselles y *col.*, 2008a; Morales-Caselles y *col.*, 2008b; Tao y *col.*, 2013; Maranhó y *col.*, 2015). Los PAHs causan una disminución en la actividad de la acetilcolinesterasa impidiendo que hidrolice el neurotransmisor de la acetilcolina (Crao y *col.*, 2012; Matozzo y *col.*, 2012).

Parámetros de estrés oxidativo: Son de partículas interés los productos de reducción del oxígeno molecular, conduciendo a la inactivación enzimática, la peroxidación lipídica (LPO), daño en el ADN y en última instancia, la muerte celular. Autores como Bebianno y Barreira (2009), Ramos-Gómez y *col.* (2011) y Crao y *col.* (2012) determinaron que los PAHs van a originar inducción de la LPO y daños en el material genético, sin embargo Martins y *col.* (2013) establecieron que la cantidad de material genético dañado es proporcional a la concentración de PAHs en sedimento, por tanto concentraciones mayores provocan una mayor alteración y viceversa. Los pesticidas y los metales van a causar una activación de la LPO (Figueira y *col.*, 2012; Tao y *col.*, 2013; Campillo y *col.*, 2013; Maranhó y *col.*, 2015). Las actividades de las enzimas antioxidantes que defienden a los organismos contra las especies citotóxicas reactivas de oxígeno (ROS), son de gran importancia en la desintoxicación de radicales a moléculas no reactivas (Van der Oost y *col.*, 2003). La glutatión peroxidasa (GPx) es una proteína que actúa como antioxidante catalizando la reducción del peróxido de hidrógeno y de peróxidos de lípidos, su actividad se inhibe ante la presencia de PAHs

(Barreira y *col.*, 2006; Bebianno y *col.*, 2009), fuel (Morales-Casellesb y *col.*, 2008) y metales (Ji y *col.*, 2015; Wang y *col.*, 2012) y por el contrario se induce ante PCBs (De Luca-Abbott y *col.*, 2005), pesticidas (Aguirre-Martinez y *col.*, 2015) y fármacos (Maranho y *col.*, 2015).

Metalotioneínas (MTs): Las proteínas de estrés son un conjunto de biomoléculas orgánicas producidas por el organismo que intervienen en la protección y reparación de la célula frente a condiciones de estrés perjudiciales (Sander, 1993). Un grupo especial de proteínas de estrés de bajo peso molecular son las llamada metalotioneínas (MTs), las cuales son inducidas cuando los individuos son afectados por metales pesados interviniendo en la regulación de metales esenciales como Cu y Zn, y en la detoxificación de éstos y otros no esenciales como Cd y Hg (Bebianno, 1995; Hamza-Chaffai y *col.*, 1999; Hamza-Chaffai y *col.*, 2003; Serafin y *col.*, 2009; Paul-Ront y *col.*, 2010; Moschino y *col.*, 2012). También los metales pesados contenidos en vertidos mineros y afluentes (Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn) favorecen la inducción de estas proteínas (Bebianno, 1995; Riba y *col.*, 2003). En cambio Moschino y *col.* (2012) observaron una disminución de la actividad de estas proteínas en sedimentos con un bajo contenido en metales trazas y alto en PCBs.

Parámetros histológicos: La inducción de enzimas específicas (e.j. transaminasas) en la sangre puede ser indicativo de la interrupción de membranas celulares en ciertos órganos (Moss y *col.*, 1986). El tamaño, la eficiencia de absorción, el crecimiento y el porcentaje de mortalidad de los hematocitos disminuyen ante la eutrofización (Li y *col.*, 2002; Hégarret y *col.*, 2005; da Silva y *col.*, 2008) esto puede ser debido a que a los bivalvos no les llegan los nutrientes suficientes debido a que estos están siendo captados por el aumento masivo de microalgas o también por la producción masiva de sustancias tóxicas procedentes de las microalgas (Hégarret y *col.*, 2005). Por otro lado, el índice de fagocitosis, de amebocitosis y la actividad lisosomal se ven reducidas antes la exposición de TBTs (Cima y *col.*, 1998; Cima y *col.*, 1999). Los vertidos mineros, los metales y los pesticidas favorecen la necrosis, la hipertrofia, hiperplasia y alteraciones en la filtración de los hematocitos (Riba y *col.*, 2005; El-Shenawy y *col.*, 2009). En cambio, los fármacos no van afectar al volumen y ni al diámetro de los hematocitos (Matozzo y *col.*, 2012).

Parámetros reproductivos: La disminución de la capacidad reproductiva de la especie como consecuencia de compuestos xenobióticos, es a largo plazo una amenaza para la supervivencia de la especie (Inoue y *col.*, 2006). La regulación hormonal es afectada por la exposición a contaminantes como los TBTs que inducen a una masculinización de las almejas hembras (Morcillo y Porte, 1998; Morcillo y *col.*, 2000). La acidificación va originar una disminución de desove debido a que el agua ácida provoca cambios en las condiciones reproductivas, causando una reabsorción de los gametos conservando más energía para sobrevivir, ya que la acidificación dificulta los procesos de calcificación de las conchas, necesitando las almejas más energía para fabricarlas (Range y *col.*,

2011). Los vertidos mineros causan daños en el tejido gonadal lo que con lleva dificultades a la hora de sintetizar gametos (Martín-Díaz y *col.*, 2005).

Parámetros Genotóxicos: La exposición de los organismos a metales y PAHs, inducen a alteraciones estructurales en el ADN, a la diversidad alélica y variaciones en la expresión del gen como consecuencia del daño genético (Shugart y *col.*, 1992; Moraga y *col.*, 2002; Ramos-Gómez y *col.*, 2011 y Crazo y *col.*, 2012; Martins y *col.*, 2013; Maranhão y *col.*, 2015).

Parámetros morfológicos: Anomalías en el crecimiento y en el desarrollo de la concha originadas principalmente por los TBTs y la acidificación. Los TBTs inducen a malformaciones en la concha (Coelho y *col.*, 2006; Inoue y *col.*, 2007) mientras que la acidificación dificulta los procesos de calcificación (Range y *col.*, 2011).

#### 4.3.3. Bioacumulación

En todos los ensayos que se ha desarrollado con los diferentes contaminantes que se han priorizado en este estudio se ha observado una biodisponibilidad de estos para la especie bioindicadora así como una acumulación en sus tejidos biológicos, principalmente en glándula digestiva y branquias.

Para concluir el presente apartado, los resultados muestran que el grupo de los metales son los compuestos que más afectan a todos los niveles de organización excepto celularmente, originando principalmente cambios fisiológicos, bioquímicos y mortalidad. Entre los compuestos emergentes, los fármacos son los que mayor peso tienen a la hora de originar variaciones en los niveles de organización, provocando mortalidad y alteraciones bioquímicas y celulares. La eutrofización es el impacto ambiental que va a ocasionar una mayor alteración en los niveles histológicos de los individuos. Por otro lado, entre los compuestos orgánicos, los que mayores efectos producen son los pesticidas con cambios a nivel bioquímico, fisiológico e histológico. La mortalidad tiene lugar en todas las fases del ciclo vital (larva-juvenil-adulto) y además se ve incrementada con el aumento de  $T^a$  y bajada del pH. De esta manera este tipo de molusco bivalvo puede ser empleado como organismo bioindicador en programas de vigilancia y monitorización ambiental de contaminantes antropogénicos.

#### **4.4. Incertidumbres y mejoras**

Los resultados ponen de manifiesto que existe un gran espectro de posibilidades de alimentación y aclimatación de los organismos. El género y el estado de reproducción de los organismos no son especificados en la gran mayoría de la literatura analizada.

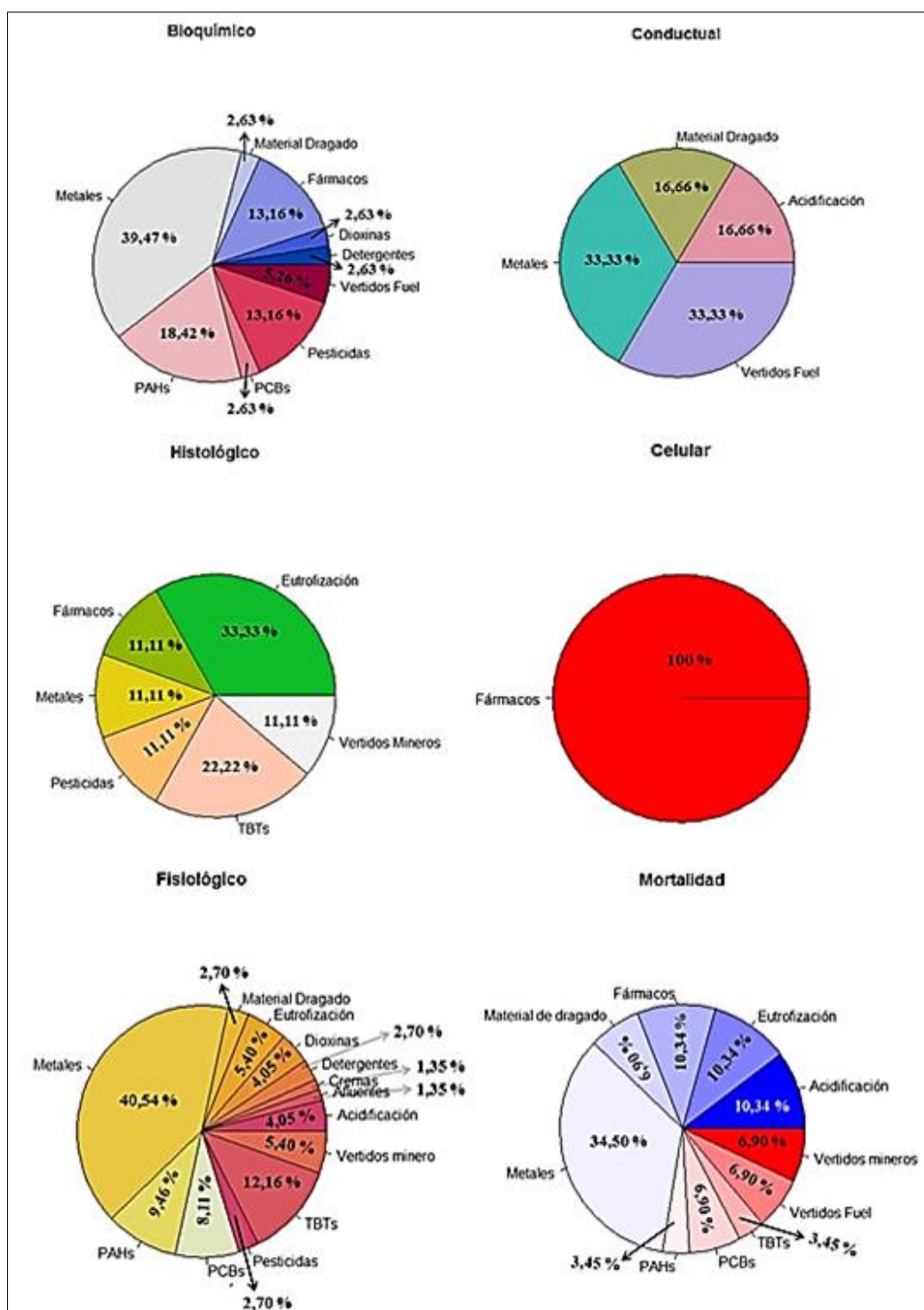


Figura 5. Valores en porcentaje de la inducción de diferentes respuestas (biomarcadores) a fuentes de estrés.

Debido a esto se pretende conseguir llamar la atención de los investigadores con el propósito de llegar a una estandarización en las condiciones de aclimatación / alimentación y a una especificación de las dos características anteriores con el objetivo de que esta herramienta de evaluación ambiental se convierta en la más idónea posible. Por otro lado, en lo que se refiere a las medidas de los diferentes biomarcadores y concentraciones de contaminantes bioacumulados, sería



necesario una puesta en común dónde las diferentes partes implicadas estandarizaran los protocolos e intercalibraran las metodologías de medida.

#### **4.5. Nuevas fuentes de estrés ambiental: Nuevos retos**

La intensificación y aumento de la frecuencia de episodios extremos climáticos es una de las facetas más importantes del cambio climático. La investigación de eventos extremos ha aumentado considerablemente en los últimos años. Sin embargo, la evaluación de la importancia de estos episodios en los ecosistemas supone un gran reto, ya que estos procesos duran un período de tiempo muy corto. Por esta razón es muy importante evaluar las respuestas hasta el momento determinadas tras la exposición a agentes químicos y variaciones de temperatura extremas, como es el caso los sistemas de estuario y las especies bioindicadoras del género *Ruditapes sp.* En este sentido el estudio del efecto de la temperatura cada vez adquiere más auge y las especies que se describen en este trabajo cumplen la idoneidad de especies bioindicadoras. Por todo, esto es necesario el desarrollo de herramientas más sofisticadas para gestionar la salud de los ecosistemas, cuando nos referimos a nuevas fuentes de contaminación como son la presencia de microplásticos, de gran interés en zonas litorales. Concretamente, y para este tipo de estudios, las especies estudiadas han demostrado ser sensibles a la contaminación por compuestos orgánicos, pudiendo contribuir de forma muy positiva en la evaluación del riesgo de estos microplásticos, sus productos de degradación y las sustancias que se adsorben a la superficie de éstos.

### **5. CONCLUSIONES**

Los resultados han mostrado que la aclimatación de las especies de invertebrados *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum* debe realizarse a una Tª de 15-20 °C, con una salinidad de 30-35, con agua del entorno natural y durante un período de tiempo de 1-7 días. Estos resultados favorecen el establecimiento de una metodología de aclimatación para comunidad científica.

Se ha demostrado la validez del género molusco bivalvo *Ruditapes sp* para evaluar no solo la calidad ambiental de los sedimentos y los ecosistemas marinos, sino del sistema bentónico e impactos ambientales, ya que en ellos se han integrado respuestas ligadas a la contaminación del sedimento y a otras vinculadas a estrés procedente de alteraciones de variables ambientales. Por tanto ha quedado de manifiesto que la inclusión de este tipo de bivalvo trae consigo importantes ventajas en la evaluación del riesgo ambiental (ERA).

Todas las sustancias analizadas en el presente estudio son acumuladas por los organismos debido a fundamentalmente a su estilo de vida filtrador, luego, *Ruditapes sp* son almejas que presentan una

gran facilidad de bioacumulación recomendando ser utilizadas en aquellos estudios destinados a la evaluación del riesgo para la salud humana ya que son especies de consumo.

Las especies del género de molusco bivalvo *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum* han demostrado ser especies bioindicadoras potenciales para la evaluación del riesgo ambiental de nuevas fuentes de contaminación y alteraciones ambientales debidas al cambio climático global.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, V., Lodeiros, C. (2001). FCV-LUZ. 11, 485-490.
- Addison, R F. (1982). Prog. Lipid. Res. 21, 47-71.
- Aguirre-Martínez, G V., Buratti, S., Fabbri, E., Del Valls, T A., Martín-Díaz, M L. (2013). J. Environ. Sci. 25, 1408-1418.
- Aguirre-Martínez, G V., Morales-Caselles, C., Del Valls, T A., Martín-Díaz, M L. (2015). Chem. Ecol. 31, 77-91.
- Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V I., Schneider, R J., Soares, A M V M., Figueira, E., Freitas, R. (2014). Aquat. Toxicol. 156, 74-87.
- Álvarez-Muñoz, D., Sáez, M., Blasco, J., Gómez-Parra, A., González-Mazo, E. (2006). Cienc. Mar. 32, 447-455.
- Alzieu, C. (1996). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 167-211.
- Antunes, S C., Freitas, R., Figueira, E., Goncalves, F., Nunes, B. (2013). Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 6658-6666.
- Barbieri E, Oliveira I R, Serralheiro PCS. (2002). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 277, 109-127.
- Barnes, R D. (1968). Saunders, Philadelphia.
- Barreira, L A., Mudge, S M., Bebianno, M J. (2006). Inc. Environ. Toxicol. 22, 203-221.
- Baudrimont, M., Schäfer, J., Marie, V., Maury, R., Bossy, C., Boudou, A., Blanc, G. (2005). Sci. Total. Environ. 337, 265-280.
- Basallote, M D., Rodríguez-Romero, A., Blasco, J., Del Valls, A., Riba, I. (2012). Environ. Sci. Pollut. Res. 19, 2550-2560.
- Bebiano, M J., Nott, J A., Langston, W J. (1993). Aquat. Toxicol. 27, 315-334.
- Bebiano, M J. (1995). Sci. Total. Environ. 171, 107-115.
- Bebiano, M J., Serafim, M A. (1998). Sci. Total. Environ. 214, 123-131.
- Bebiano, M J., Barreira, L A. (2009). Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 1849-1860.
- Beiras, R., Albentosa, M. (2004). Aquaculture. 230, 205-213.
- Blasco, J., Puppo, J. (1999). Comp. Biochem. Physiol. C. 122, 253-263.
- Boscolo, R., Cacciatore, F., Berto, D., Giani, M. (2007). Food. Chem. Toxicol. 45, 1065-1075.
- Bryan, G W., Gibbs, P., Hummerstone, L G., Burt, G R. (1986). J. Mar. Biol. Assoc. UK. 66, 611-640.
- Campillo, J A., Albentosa, M., Valdés, N J., Moreno-González, R., León, V M. (2013). Aquat. Toxicol. 142-143, 365-379.
- Canova, S., Degan, P., Peters, L D., Livingstone, D R., Voltan, R., Venier, P. (1998). Mutat. Res. 399, 17-30.
- Caro, A., Chereau, G., Briant, N., Roques, C., Freydier, R., Delpoux, S., Escalas, A., Elbaz-Poulichet, F. (2015). Sci. Total. Environ. 505, 526-534.
- Casado-Martínez, M C., Blasco, J., González-Castromil, M A., Riba, I., Del Valls, T A. (2006). Ciencias Marinas. 32, 159-166.
- Casatta, N., Mascolo, G., Roscioli, C., Viganò, L. (2015). Sci. Total. Environ. 511, 214-222.
- Choi, J Y., Yun, J., Yang, D B., Ra, K., Kim, K T., Hong, G H., Shin, K H. (2011). Mar. Environ. Res. 71, 162-168.
- Chora, S., Starita-Geribaldi, M., Guigonis, J M., Samson, M., Roméo, M., Bebianno, M J. (2009). Aquat. Toxicol. 94, 300-308.
- Cima, F., Marín, M G., Matozzo, V., Da Ros, L., Ballarin, L. (1998). Chemosphere. 37, 3035-3045.
- Cima, F., Marín, M G., Matozzo, V., Da Ros, L., Ballarin, L. (1999). Mar. Pollut. Bull. 39, 112-115.
- Coelho, M R., Langston, W J., Bebianno, M J. (2006). Chemosphere. 63, 1499-1505.
- Commandeur, J N M., Stijntjes, G J., Vermeulen, N P E. (1995). Pharmacol. Rev. 47, 271-330.
- Cravo, A., Pereira, C., Gomes, T., Cardoso, C., Sefaim, A., Almeida, C., Rocha, T., Lopes, B., Company, R., Medeiros, A.,

- Noberto, R., Pereira, R., Araújo, O., Bebiannp, M J. (2012). *Mar. Environ. Res.* 75, 23-34.
- da Silva, P M., Hégaret, H., Lambert, C., Wikfors, G H; Le Goïc, N., Shumway, S E., Soudant, P. (2008). *Toxicol.* 51, 563-573.
- De Luca-Abbott, S B., Richardson, B J., McClellan, K E., Zheng G J., Martin, M., Lam, P K S. (2005). *Mar. Pollut. Bull.* 51, 694-707.
- Darrigan, G., Damborenea, C. (2001). *ACTAS Seminario Internacional sobre Gestión Ambiental e Hidroelectricidad-Complejo Hidroeléctrico de Salto Grande.* 119-123.
- Daughton, C G., Ternes, T A., 1999. *Environ. Health Perspect.* 107, 907-938.
- Dellali, M. Barelli, M G., Romeo, M., Aissa, P. (2001). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 130, 227-235.
- Del Valls, T A., Conradi, M. (2000). *Cienc. Mar.* 26, 39-64.
- Depledge, M H., Fossi, M C. (1994). *Ecotoxicology.* 3, 161-172.
- Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K S., Soudant, P. (2009). *Aquaculture.* 297, 10-24.
- Doong, R A., Peng, C K., Sun, Y C., Liao, P L. (2002). *Mar. Pollut. Bull.* 45, 246-253.
- El-Shenawy, N S., Moawad, T I S., Mohallal, M E., Abdel-Nabi, I M., Taha, I A. (2009). *Ocean. Sci. J.* 44, 27-34.
- FAO. (1996). *Food and Agriculture Organization of the United Nations.* Rome 82, 399-400.
- FAO. (2005) In: Goulletquer, P. (Ed.), *Cultured Aquatic Species Information Programme.* FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome.
- Fathallan, S., Medhioub, M N., Medhioub, A., Kraiem, M M. (2011). *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* 3, 277-285.
- Fent, K., Weston, A A., Caminada, D. (2006). *Aquat. Toxicol.* 76, 122-159.
- Fernández-Reiriz, Mª J., Range, P., Álvarez-Salgado, X A., Labarta, U. (2011). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 433, 97-105.
- Figueira, E., Cardoso, P., Freitas, R. (2012). *Comp. Biochem. Physiol Part C.* 156, 80-86.
- Gagné, F., Blaise, C., André, C. (2006). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 329-336.
- Garg, A., Antón-Martín, R., García-Luque, E., Riba, I., Del Valls, T A. (2009). *Ecotoxicology.* 18, 1029-1035.
- Gibbs, P E., Bryan, G W. (1996). *Cambridge University Press, Cambridge,* pp. 212-236.
- Gosling, E. (2003). *Fishing News Books, Oxford.*
- Hamza-Chaffai, A., Amiard, J C., Cosson, R P. (1999). *Comp. Biochem. Phys. C.* 123, 153-163.
- Hamza-Chaffai, A., Amiard, J C., Pellerin, J., Joux, L., Berthet, B. (2000). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 127, 185-197.
- Hamza-Chaffai, A., Pellerin, J., Amiard, J C. (2003). *Environ. Int.* 28, 609-617.
- Harley, C D G., Randall Hughes, A., Hultgren, K M., Miner, B G., Sorte, C J B., Thornber, C S., Rodriguez, L F., Tomanek, L., Williams, S. L. (2006). *Ecol. Lett.* 9, 228-241.
- Hégaret, H., da Silva, P M., Wikfors, G H., Lambert, C., De Bettignies, T., Shumway, S E., Soudant, P. (2007). *Aquat. Toxicol.* 84, 469-479.
- Hill, W R., Wyse, G A. (2004). *Ed. Médica Panamericana.* ISBN: 8479039906, 9788479039905.
- Inoue, S., Abe, S I., Oshima, Y., Kai, N., Honjo, T. (2006). *Environ. Toxicol.* 21, 244-249.
- Inoue, S., Oshima, Y., Usuki, H., Hamaguchi, M., Hanamura, Y., Kai, N., Shimasaki, Y., Honjo, T. (2006). *Chemosphere.* 63, 881-888.
- Inoue, S., Oshima, Y., Usuki, H., Hamaguchi, M., Hanamura, Y., Kai, N., Shimasaki, Y., Honjo, T. (2007). *Chemosphere.* 66, 1353-1357.
- Isono, R S., Kita, J., Kishida, C. (1998). *Document. Nippon. Suisan. Gakkaishi.* 64, 373-376.
- Jensen, A C., Humphreys, J., Caldow, R W G., Grisley, C., Dyrinda, P E J. (2004). *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 84, 1069-1073.
- Ji, J., Choi, H J., Ahn, I Y. (2006). *Mar. Pollut. Bull.* 52, 447-468.
- Ji, C., Cao, L., Li, F. (2015). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 545-554.
- Jones, K C., de Voogt, P. (1999). *Environ. Pollut.* 100, 209-221.
- Kaplan, E L., Meier, P. (1958). *Journal of the American Statistical Association.* 53, 457-481.
- Kawai, S., Fukushima, M., Miyazaki, N., Tatsukawa, R. (1988). *Mar. Pollut. Bull.* 19, 129-133.
- Langston, W J. (1995). *Pestic. Outlook.* 95, 18-24.
- Lech, J J., Vodick, M.J. (1985). *Biotransformation.* In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology; Methods and Applications.* Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA, pp. 526-557.
- Li, S C., Wang, W X., Hsieh, D P H. (2002). *Mar. Environ. Res.* 53, 145-160.

- Livingstone, D R. (1991). *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 7, 45-185.
- Liu, X., Zhang, L., You, L., Cong, M., Zhao, J., Wu, H., Li, C., Liu, D., Yu, J. (2011). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 323-332.
- López, I R., Kalman, J., Vale, C., Blasco, J. (2010). *Environ. Sci. Pollut. R.* 17, 1519-1528.
- MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gob. Es. (2010). 3-125.
- MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gob. Es. Almedas.
- Maranho, L A., Del Valls, T A., Martín- Díaz, M L. (2015). *Mar. Pollut. Bull.*
- Mariño-Balsa, J C., Pérez, P., Estévez-Blanco, P., Saco-Álvarez, L., Fernández, E., Beiras, R. (2003). *Cienc. Mar.* 29, 115-122.
- Martín-Díaz, M L. (2004). Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- Martín-Díaz, M L., Blasco, J., González De Canales, M., Sales, D., Del Valls, T A. (2005). *Rev. Environ. Contam. T.* 48, 233-241.
- Martín-Díaz, M L., Jiménez-Tenorio, N., Sales, D., Del Valls, T A. (2008)a. *Chemosphere.* 71, 1916-1927.
- Martín-Díaz, M L., Blasco, J., Sales, D., Del Valls, T A. (2008)b. *Environ. Pollut.* 151, 631-640.
- Martins, M., Costa, P M., Ferreira, A M., Costa, M H. (2013). *Aquat. Toxicol.* 142-143, 85-95.
- Matozzo, V., Rova, S., Marin, M G. (2012). *Mar. Environ. Res.* 79, 116-121.
- McManus, G B., Wyman, K D., Peterson, W T. and Wurster, C F. (1983). *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 17, 421-430.
- Melancon, M J., Alscher, R., Benson, W., Kruzynski, G., Lee, R.F., Sikka, H.C., Spies, R.B. (1992). Metabolic products as biomarkers. En: Huggett, R J., Kimerly, R A., Mehrle, P M., Jr, Bergman, H L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress.* Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 87-124.
- Moraga, D., Mdelgi-Lasram, E., Romdhane, M S., El Abed, A., Boutet, I., Tanguy, A., Auffret, M. (2002). *Mar. Environ. Res.* 54, 521-525.
- Morales-Caselles, C. (2007). Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- Morales-Caselles, C., Martín-Díaz, M L., Riba, I., Sarasquete, C., Del Valls, T A. (2008)b. *Chemosphere.* 72, 819-825.
- Morales-Caselles, C., Martín-Díaz, M L., Riba, I., Sarasquete, C., Del Valls, T A. (2008)b. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1309-1316.
- Morcillo, Y., Ronis, M J J., Porte, C. (1998). *Aquat. Toxicol.* 42, 1-13.
- Morcillo, Y., Porte, C. (2000). *Environ. Pollut.* 107, 47-52.
- Moschino, V., Dealney, E., Da Ros, L. (2012). *Environ. Pollut.* 171, 52-60.
- Moss, D W., Henderson, A R., Kochmar, J F. (1986). n: Tietz, N.W. (Ed.), *Textbook of Clinical Chemistry.* Saunders, Philadelphia, PA, pp. 663-678.
- Munari, M., Matozzo, V., Marin, M G. (2011). *Fish. Shellfish. Immun.* 30, 1024-1030.
- National Research Council. (1987). *Environ. Health. Perspect.* 74, 3-9.
- Paul-Pont, I., Montaudouin, X., Gonzalez, P., Jude, F., Raymond, N., Paillard, C., Baudrimont, M. (2010). *Environ. Pollut.* 158, 3401-3410.
- Pennings, S. C., and M. D. Bertness. (2001).M. D. Bertness, S. D. Gaines, and M. Hay, eds. *Sinauer Associates, Sunderland, MA.* 289-316.
- Pérez-Cadahía, B., Laffon, B., Pásaro, E., Méndez, J. (2004). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 138, 453-460.
- Range, P., Chícharo, M A., Ben-Hamadou, R., Piló, D., Matias, D., Joaquin, S., Oliveira, A P., Chícharo, L. (2011). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 396, 177-184.
- Ramos Gómez, J. (2011). Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- Ramos-Gómez, J., Coz, A., Viguri, J R., Luque, A., Martín-Díaz, M.L., Del Valls, T A. (2011). *Environ. Pollut.* 159, 1914-1922.
- Reitzel, A M., Burton, P M., Krone, C., Finnerty, J R. (2008). *Biol. Bull.* 214, 233-254.
- Riba, I., García-Luque, E., Blasco, J., Del Valls, T A. (2003). *Chemical Speciation and Bioavailability.* 15, 101-114.
- Riba, I., Del Valls, T A., Forja, J M., Gómez-Parra, A. (2004). *Environ. Toxicol. Chem.* 48, 233-241.
- Riba, I., Del Valls, T A., Forja, J M., Gómez-Parra, A. (2004)a. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1100-1107.
- Riba, I., Blasco, J., Jiménez-Tenorio, N., González de Canales, M L., Del Valls, T A. (2005). *Chemosphere.* 58, 671-682.
- Ritsema, R., Laane, R W. (1991). *Mar. Environ. Res.* 32, 243-260.

- Roméo, M., Gnassia-Barelli, M. (1997). *Comp. Biochem. Phys. C* 118, 33–37.
- Rodrigues, E T., Pardal, Â M. (2014). *Environ. Int.* 70, 158–182.
- Rodríguez-Romero, A., Jiménez-Tenorio, N., Basallote, M D., De Orte, M R., Blasco, J., Riba, I. (2014). *Environ. Sci. Technol.* 48, 12292–12301.
- Sacchi, A., Mouneyrac, C., Bolognesi, C., Sciutto, A., Roggieri, P., Fusi, M., Beone, G M., Capri, E. (2013). *Environ. Pollut.* 177, 82–89.
- Sáez, M., León, V M., Gómez-Parra, A., González-Mazo, E. (2000). *J. Chromatogr. A* 889, 99–104.
- Salazar, M H., Salazar, S M. (1988). In: Institute of Electrical and Electronic Engineers (Eds.). *Proceedings Oceans'88 International Organotin Symposium*, New York, pp. 1188–1197.
- Sanders, B M. (1993). *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 49–75.
- Sakurai, I., Seto, M., Nakao, S. (1996). *Document. Nippon. Suisan. Gakkaishi*. 62, 878–885.
- Serafim, A., Bebianno, M J. (2009). *Environ. Res.* 109, 390–399.
- Seram, A., Bebianno, M J. (2010). *Aquat. Toxicol.* 99, 370–378.
- Servos M R. (1999). *Wat. Qual. Res. J. Canada*. 34, 123–177.
- Sfriso, A., Chiara, F., Raccanelli, S. (2014). *Environ. Pollut.* 184, 290–297.
- Shugart, L R., Bickham, J., Jackim, G., McMahon, G., Ridley, W., Stein, J., Steinert, S. (1992). *Lewis Publishers*, Chelsea, MI, USA, pp. 155–210.
- Smaoui-Damak, W., Hamza-Chaffai, A., Bebianno, M J., Amiard, J C. (2004). *Comp. Biochem. Phys. C* 139, 181–188.
- Swartz, R C., Schults, D W., DeWitt, T H., Ditsworth, G R., Lamberson, J O. (1990). *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1074–1080.
- Tao, Y., Pan, L., Zhang, H., Tian, S. (2013). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 22–30.
- Thomas, P M., Foster, G D. (2004). *J. Environ. Sci. Heal. A*. 39, 1969–1978.
- Toba, M., Kosemura, T., Yamakawa, H., Sugiura, Y., Kobayashi, Y. (2008). *Plank. Benth. Res.* 3, 165–173.
- U.S. Environmental Protection Agency, Exposure Analysis and Risk Characterization Group. (1998). *US-EPA, EPA/600/P-98/002Aa*, Washington D.C.
- Usero, J., González-Regalado, E., Garcia, I. (1997). *Environ. Int.* 23, 291–298.
- Vallack, H W., Bakker, D J., Brandt, I., Brorström-Lundén, E., Brouwer, A., Bull, K R., Gough, C., Guardans, R., Holoubek, I., Jansson, B., Koch, R., Kuylenstierna, J., Lecloux, A., Mackay, D., McCutcheon, P., Mocarelli, P., Taalman, R.D.F. (1998). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 6, 143–175.
- Usero, J., González-Regalado, E., Gracia, I. (1997). *E. I.* 23, 291–298.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen N P E. (2003). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Wang, Z., Yan, C., Vulpe, C D., Yan, Y., Chi, Q. (2012). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 90–98.
- Weigel, S., Berguer, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thorensen, H., Hühnerfuss, H. (2004). *Chemosphere*. 56, 583–592.
- Winston, G W., Di Giulio, R T. (1991). *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.
- Yang, F., Zhao, L., Yan, X., Wang, Y. (2013). *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 10, 1392–1405.
- Zhang, L., Liu, X., You, L., Zhou, D., Wu, H., Li, L., Zhao, J., Feng, J., Yu, J. (2011). *Mar. Environ. Res.* 72, 33–39.
- Zhang, L., Gan, J., Ke, C., Liu, X., Zhao, J., You, L., Yu, J., Wu, H. (2012). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 85–91.
- Zheng, L., Cui, W., Song, W., Qu, L., Yuan, Y., Yang, D. (2012). *Procedia. Environ. Sci.* 16, 118–124.

## 7. ANEXO

### 7.1. Código en lenguaje R para la realización de los diagramas de sectores

La librería utilizada es `colorspace` y la función empleada para representar los diagramas de sectores es `pie`, que constan de los siguientes argumentos:

1. `x`: un vector de cantidades numéricas no negativas. Los valores de `x` representan el tamaño de las porciones del diagrama.
2. `labels`: expresiones o cadenas de caracteres que dan nombres a las porciones.
3. `edges`: el contorno circular del diagrama se aproxima por un polígono con esta cantidad de bordes.
4. `radius`: dibuja diagrama centrandolo a un cuadrado cuyos lados van de -1 a 1.
5. `clockwise`: indica si la posición de las porciones es a la derecha o izquierda.
6. `init.angle`: número que especifica el ángulo de partida de las porciones.
7. `density`: densidad de líneas de sombreado.
8. `angle`: la pendiente de las líneas de sombreado, dada como un ángulo en grados (hacia la izquierda).
9. `col`: un vector de colores que se utiliza en el llenado o sombreado de las porciones.
10. `border`: vectores que definen el lado de las porciones.
11. `main`: título principal del gráfico.

```
library (colorspace, pos=4)
#Aclimatación
#Días
pie(table(Días$Días), labels=levels(Días$Días), xlab="Número de días", ylab="Frecuencia",
main="Número de días",clockwise=TRUE, edges=1000, radius=1,
col=rainbow_hcl(length(levels(Días$Días))))
#Temperatura
pie(table(Temperatura$Temperatura), labels=levels(Temperatura$Temperatura),
xlab="Temperatura", ylab="Frecuencia", main="Temperatura",clockwise=TRUE, edges=1000,
radius=1, col=rainbow(33, alpha = .9))
```

#### #Salinidad

```
pie(table(Salinidad$Salinidad), labels=levels(Salinidad$Salinidad), xlab="Salinidad",  
ylab="Frecuencia", main="Salinidad",clockwise=FALSE, edges=1000, radius=1,  
col=topo.colors(10, alpha = .9))
```

#### #Origen de agua de mar

```
pie(table(Origen$Origen), labels=levels(Origen$Origen), xlab="Origen",  
ylab="Frecuencia", main="Origen de agua mar",clockwise=FALSE, edges=1000, radius=1,  
col=rainbow(5, alpha = .9))
```

#### #Captura

```
pie(table(Origen$Captura), labels=levels(Origen$Captura), xlab="Captura",  
ylab="Frecuencia", main="Procedencia de la captura",clockwise=FALSE, edges=1000,  
radius=1, col=terrain.colors(5, alpha = .9))
```

#### #Experimento

##### #Lugar de experimentación

```
pie(table(Experimento$Experimento), labels=levels(Experimento$Experimento),  
xlab="Experimento", ylab="Frecuencia", main="Experimento",clockwise=TRUE, edges=1000,  
radius=1, col=rainbow(4, alpha = .9))
```

##### #Sustancias de Laboratorio

```
pie(table(Sustancias_Lab$Sustancias), labels=levels(Sustancias_Lab$Sustancias),  
xlab="Sustancias", ylab="Frecuencia", main="Sustancias",clockwise=T, edges=10000,  
radius=1.19, col=rainbow(length(levels(Sustancias_Lab$Sustancias))))
```

##### #Sustancias de Campo

```
pie(table(Sustnacias_Campo$Sustancias),labels=levels(Sustnacias_Campo$Sustancias),  
xlab="Sustancias", ylab="Frecuencia", main="Sustancias",clockwise=T, edges=10000,  
radius=1, col=rainbow(9, alpha= .9))
```

#### #Biomarcadores

##### #Conductual

```
pie(table(Biomarcadores$Conductual), labels=levels(Biomarcadores$Conductual),  
xlab="Conductual", ylab="Frequency", main="Conductual",  
col=rainbow_hcl(length(levels(Biomarcadores$Conductual))))
```

#Mortalidad

```
pie(table(Biomarcadores$Mortalidad), labels=levels(Biomarcadores$Mortalidad),
xlab="Mortalidad", ylab="Frequency", main="Mortalidad",
col=diverge_hsv(length(levels(Biomarcadores$Mortalidad))))
```

#Fisiológico

```
pie(table(Biomarcadores$Fisiológico), labels=levels(Biomarcadores$Fisiológico),
xlab="Fisiológico", ylab="Frequency", main="Fisiológico",
col=heat_hcl(length(levels(Biomarcadores$Mortalidad))))
```

#Bioquímico

```
pie(table(Biomarcadores$Bioquímico), labels=levels(Biomarcadores$Bioquímico),
xlab="Bioquímico", ylab="Frequency", main="Bioquímico",
col=diverge_hcl(length(levels(Biomarcadores$Bioquímico))))
```

#Celular

```
pie(table(Biomarcadores$Celular), labels=levels(Biomarcadores$Celular), xlab="Celular",
ylab="Frequency", main="Celular", col=rainbow(length(levels(Biomarcadores$Celular))))
```

#Histológico

```
pie(table(Biomarcadores$Histológico), labels=levels(Biomarcadores$Histológico),
xlab="Histológico", ylab="Frequency", main="Histológico",
col=terrain_hcl(length(levels(Biomarcadores$Histológico))))
```

## 7.2. Tablas de aclimatación

### 1. Acidificación.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
-	21-22	30-31	-	Natural filtrada	<i>I galbana</i> <i>C calcitrans</i>	Acuicultura	Range y col., (2011)
7	20±1	31 ±1	-	Artificial	<i>T chuii</i> <i>I galbana</i> <i>C gracilis</i>	Acuicultura	Basallote y col., (2012)
14	21-23	30-32	-	Natural filtrada	<i>I galbana</i> <i>C calcitrans</i>	Acuicultura	Fernández-Reiriz y col., (2011)



7	17,52±0,91	34,61±1,8	16 h L: 8h D	Artificial	<i>T chuii</i> <i>I galbana</i> <i>Cgracilis</i>	Natural	Rodríguez-Romero y col., (2014)
---	------------	-----------	--------------	------------	--	---------	---------------------------------

## 2. Afluentes.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
-	-	-	-	-	-	Natural	Bebianno, (1995)

## 3. Cremas.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
-	-	-	-	-	-	Natural	Casatta y col., (2015)

## 4. Detergentes.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
-	-	-	-	-	-	Acuicultura/ Natural	Sáez y col., (2000)
2	C11-LAS 21,6 NPEO2,8 22,3	35,94	-	-	-	Acuicultura	Álvarez-Muñoz y col., (2006)

## 5. Dioxinas.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
-	-	-	-	Natural	-	Acuicultura	Friso y col., (2014)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Boscolo y col., (2007)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Raccanelli y col., (2008)

## 6. Eutrofización.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Adriano y <i>col.</i> , (2005)
7	16-18	-	-	Artificial	-	Natural	da Silva y <i>col.</i> , (2008)
-	-	-	-	-	-	-	Kim y <i>col.</i> , (2011)
7	20-21	31-32	-	Natural	<i>T pseudonana</i>	Natural	Li y <i>col.</i> , (2002)
7	18	-	-	-	<i>C neogracile</i>	Natural	Hégaret y <i>col.</i> , (2007)
-	-	-	-	-	-	Natural	Toba y <i>col.</i> , (2008)

## 7. Fármacos.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
7	18±2	35,3 ±1,4	-	Artificial	-	Acuicultura	Maranho y <i>col.</i> , (2015)
7	15	33,8	12 h L:12 h D	Artificial	-	Acuicultura	Aguirre-Martínez y <i>col.</i> , (2013)
7	17	35	-	Artificial	<i>I galvana</i>	Acuicultura	Matozzo y <i>col.</i> , (2012)
2	18	25	12 h L:12 h D	Artificial	-	Natural	Almeida y <i>col.</i> , (2014)
2	20	28	12 h L:12 h D	Artificial	-	Natural	Antunés y <i>col.</i> , (2013)

## 8. Material de dragado.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
14	15	33	-	-	Preparado de algas	Acuicultura	Martín-Díaz y <i>col.</i> , (2008)a
2	-	-	-	-	-	Acuicultura	Martín-Díaz y <i>col.</i> , (2008)b
14	15-20	36-40	Natural de la estación, luz continua	Natural	<i>I galvana</i> <i>T chuii</i> <i>C gracilis</i>	Acuicultura	Casado-Martínez y <i>col.</i> , (2006)

### 9. Vertido minero.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Riba y col., (2005)a
-	-	-	-	Natural	-	Acuicultura	Riba y col., (2005)b
30	15±1	10-35	12 h L:12 h D	Artificial	<i>T chuii</i> , <i>I galbana</i> <i>C gracilis</i>	Acuicultura	Martín-Díaz y col., (2004)
15	20	10-20-35	-	Artificial	-	-	Riba y col., (2003)

### 10. Vertidos fuel.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
-	-	-	-	-	-	Acuicultura	Morales-Caselles y col., (2008)a
-	20±1	-	-	Artificial	-	Acuicultura	Mariñoy col., (2003)
10	19±1	-	Natural	Artificial	Preparado de algas	Acuicultura	Morales-Caselles y col., (2008)b
15	20	10,20,35	-	Artificial	<i>T.chuii</i> <i>I galvana</i> , <i>C.gracilis</i>	Acuicultura	Riba y col., (2004)

### 11. PCBs.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
7	20	35	-	Natural	<i>I galbana</i> , <i>T suecica</i>	Natural	Ferreira y col., (1998)
-	-	-	-	-	-	Natural	Choi y col., (2014)
8	-	-	-	Natural filtrada	-	Natural	De Luca-Abbott y col., (2005)
-	-	-	-	-	-	Natural	Choi y col., (2010)
-	16	-	-	-	-	Acuicultura	Moschino y col., (2010)
-	-	-	-	-	-	Natural	Moschino y col., (2012)

## 12. Pesticidas.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
14	12±0,5	31	-	Artificial filtrada arena	<i>S platensis</i>	Natural	Tao y col., (2013)
2	17-19	30 ±0,5	-	Artificial filtrada	-	Natural	Choi y col., (2011)
1	19	39	-	Artificial	<i>I. galbana</i>	Natural	Campillo y col., (2013)
1	-	-	-	-	-	Natural	Wang y col., (2007)
7	18-20	10	12 h L:12 h D	Artificial salobre aireada	-	Natural	El-Shenawy y col., (2009)
2	19±1	33±0,3	12 h L:12 h D	Artificial filtrada	-	Acuicultura	Aguirre-Martinez y col., (2014)

## 13. TBTs.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
30	20	36	-	Artificial	<i>I galvana</i>	Acuicultura	Coelho y col., (2006)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Solé y col., (2000)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Inoue y col., (2007)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Inoue y col., (2006)a
-	-	-	-	-	-	Acuicultura	Morcillo y col., (2000)
-	-	-	-	- (filtrada)	-	Acuicultura	Morcillo y col., (1998)
2	-	-	-	Natural (filtrada 15-20 µm)	-	Natural	Fernández y col., (2013)
10	-	-	-	-	-	Acuicultura	Garg y col., (2009)
-	-	-	-	-	-	Natural	Inoue y col., (2006)b
-	-	-	-	-	-	Natural	Cima y col., (1999)
-	-	-	-	-	<i>Pheodactylum</i>	Natural	Cima y col., (1998).

#### 14. PAHs.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
0, 1, 3, 7, 14, 28	-	-	-	Natural	-	Natural	Bebianno y <i>col.</i> , (2009)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Cravo y <i>col.</i> , (2012)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Moschino y <i>col.</i> , (2012)
7	-	-	-	Natural (Aireada y Filtrada)	-	Natural	Martins y <i>col.</i> , (2013)
7	-	-	-	Natural (Filtrada)	-	Natural	De-Luca Abbott y <i>col.</i> , (2005)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Matozzo y <i>col.</i> , (2012)
14	-	-	-	-	-	-	Ramos-Gómez y <i>col.</i> , (2011)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Solé y <i>col.</i> , (2000)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Barreira y <i>col.</i> , (2006)

#### 15. Metales.

Nº de días.	Temperatura (°C)	Salinidad	Fotoperiodo (L: luz, O: Oscuridad)	Origen agua de mar	Tipo alimentación	Procedencia Captura	Referencias
7	25	33	-	Natural	<i>C vulgaris beji</i>	Acuicultura	Ji y <i>col.</i> , (2015)
15	18	35	-	Natural	-	Acuicultura	Kamel y <i>col.</i> , (2012)
7	18	-	-	Natural (Filtrada-150 µm)	-	Acuicultura	Wang y <i>col.</i> , (2012)
7	-	-	-	Natural	-	Acuicultura	Maranho y <i>col.</i> , (2015)
7	-	-	-	Natural (Filtrada-200 µm)	-	Natural	Serafim y <i>col.</i> , (2010)
-	-	-	-	-	-	-	Hamza-Chaffai y <i>col.</i> , (2000)
-	-	-	-	-	-	-	Boudrimont y <i>col.</i> , (2005)

-	-	-	-	-	-	-	Hamza-Chaffai y col., (1999)
10	25	32	-	-	<i>C vulgaris beiji</i>	Acuicultura	Zhang y col., (2012)
-	-	-	-	-	-	Natural	Moschino y col., (2012)
7	-	-	-	Natural (Filtrada)	-	Acuicultura	Blasco y col., (1999)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Caro y col., (2015)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Smaui-Damak y col., (2009)
7	-	-	-	-	-	Natural	Serafim y col., (2009)
7	18	35	-	-	-	Natural	Chora y col., (2009)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Hamza-Chaffai y col., (2003)
3	-	-	-	-	-	Acuicultura	Roméo y Gnana Barelli (1997)
3	-	-	-	-	-	Natural	Paul Ront y col., (2010)
-	28-32	38-40	-	Natural	-	Natural	Smaoui-Damark y col., (2004)
-	-	-	-	-	-	Acuicultura	Beiras y col., (2004)
20	17	34	-	Contaminada	-	Natural	Sime y col., (2003)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Moraga y col., (2002)
-	-	-	-	-	-	Natural	Figueira y col., (2012)
-	-	-	-	-	-	Natural	Chora y col., (2008)
10	25	32	-	Natural (aireado)	<i>C vulgaris beiji</i>	Acuicultura	Zhang y col., (2011)
7	25	33	-	Natural (aireado)	<i>C vulgaris beiji</i>	Acuicultura	Liu y col., (2010)
-	-	-	-	-	-	Acuicultura	Sacchi y col., (2013)

7	-	-	-	-	-	Natural	Bebiamno y <i>col.</i> , (1998)
7	15	34	-	Natural (aireado)	-	Natural	Bebiamno y <i>col.</i> , (1993)
14	15	33.8	-	-	Preparado algas	Acuicultura	Martín-Díaz y <i>col.</i> , (2008)a
7	21	34	-	Natural (filtrada-arena filtro-aireada)	-	Natural	Umasuthan y <i>col.</i> (2012)
-	-	-	-	-	-	-	Ramos-Gómez y <i>col.</i> , (2011)
3	-	-	-	-	-	Natural	Shin y <i>col.</i> , (2002)
-	-	-	-	-	-	Natural	Dellali y <i>col.</i> , (2001)
-	-	-	-	-	-	Natural	Jungyounji y <i>col.</i> , (2006)
-	-	-	-	-	-	-	Usero y <i>col.</i> , (1997)
3	18	38	-	-	-	Acuicultura	Gnassia-Barelli y <i>col.</i> , (1995)
2	-	-	-	-	-	-	Martín-Díaz y <i>col.</i> , (2008)b
-	-	-	-	-	-	Natural	Liang y <i>col.</i> , (2003)
-	-	-	-	Natural	-	Natural	Zheng y <i>col.</i> , (2012)
-	-	-	-	-	-	-	Del Valls y <i>col.</i> , (2002)

### 7.3. Tablas de respuestas

#### 1. Acidificación.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
CO <sub>2</sub>	75 días (lab)	0,4-0,7 pH	No diferencia en calcificación, pH, talla y peso, desove (-), mortalidad embriones (+)	Range y <i>col.</i> , (2011)
CO <sub>2</sub>	10 días (lab)	8-7,5-7,6-5,6-5,5 pH	Mortalidad (+)	Basallote y <i>col.</i> , (2012)

CO <sub>2</sub>	87 días (lab)	0,4-0,7 pH	Talla (-), ingestión (-), respiración (-), excreción amonio (+), crecimiento (-)	Fernández-Reiriz y <i>col.</i> , (2011)
Sedimentos	10 días (lab)	7,1-6,6 pH	Daño tejido agallas y digestivo, actividad entierro (-), mortalidad (+), acumulación (+)	Rodríguez-Romero y <i>col.</i> , (2014)

## 2. Afluentes.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
Cd	30 días (lab)	100/400 µg/l	Acumulación (+)	Bebiano, (1995)
Cu	30 días (lab)	50 µg/l	MT (+)	
Fe	30 días (lab)	-		
Mn	30 días (lab)	-		
Pb	30 días (lab)	-		
Zn	30 días (lab)	-		

## 3. Cremas.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
PCP	- (campo)	-	Acumulación (+)	Casatta y <i>col.</i> , (2015)

## 4. Detergentes.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
C <sub>11</sub> -SPS C <sub>11</sub> -LAS	6h(lab) 6h (lab)	0,2-1-5-10-20-50- 100 µg/g 1-5-10-25-50- 100µg/g	Acumulación (+)	Sáez y <i>col.</i> , (2000)
C <sub>11</sub> -LAS NPEO <sub>2,8</sub>	120 h(lab) 120 h(lab)	2,4-6,7-12,8 µg/g 13,4-14,8-31,7 µg/g	CAT (+), AcP (-), ALP (+), acumulación (+) CAT (-), actividad enzimática específica (+),	Álvarez-Muñoz y <i>col.</i> , (2006)

## 5. Dioxinas.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
PCDD PCDF	2 años (campo) 2 años (campo)	2,3,7,8 pg/g 2,3,7,8 pg/g	Acumulación (+)	Friso y <i>col.</i> , (2014)
PCBs	122 días (campo)	25 µl	Acumulación (+)	Boscolo y <i>col.</i> , (2007)
PCDD/F PCBs	285 días (campo)		Acumulación (+) detoxificación (+)	Raccanelli y <i>col.</i> , (2008)



## 6. Eutrofización.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
Macroalga	- (campo)	-	Algas mayor COT Almejas mayor COT	Adriano y col., (2005)
<i>Karenia selliformis</i> <i>Chaetoceros neogracile</i>	6 semanas (lab) 6 semanas (lab)	$10^2$ - $10^3$ cells/ml $4 \times 10^8$ cells/ día	Tamaño hematocito (-), % células apoptotic ( $\pm$ ), AGT (+), mortalidad (+), THC ( $\pm$ ), intensidad de infección (+)	da Silva y col., (2008)
<i>Heterocapsa circularisquama</i> <i>Chattonella marina</i>	60 h (lab) 60 h (lab)	$3-4 \times 10^4$ cells/ml $3-4 \times 10^4$ cells/ml	Acumulación (+), actividad filtración (-), lysomal destabilización (+), mortalidad (+), daño tejido agallas (+)	Kim y col., (2011)
<i>Alexandrium tamarense</i> (STX)	15 días	0-5-10-15-20 $\mu$ g	Talla (-), eficiencia de absorción (-), crecimiento (-), cuerpo tóxico (+), SFG (-)	Li y col., (2002)
<i>Karenia selliformis</i> <i>Karenia mikimotoi</i>	7 días 7 días	500 cells/ml $10^3$ cell/ml	Hematocitos total (+), % hematocitos muertos (-), talla hematocito (-), complejidad (-), mortalidad ( $\pm$ ), contenido total de proteínas (+), ROS (-), AGT ( $\pm$ )	Hégaret y col., (2007)
$[\text{O}_2]$	0-18 días	0,2-2,8-3,2-6 mg/l	Densidad larvaria (-), radio de natación (-), mortalidad larvaria (+), sedimentación larva (+), reclutamiento (-), dispersión larva (-)	Toba y col., (2008)

## 7. Fármacos.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
Antibióticos Antiácidos Anti-hipertensivos Anti-inflamatorios Reguladores	14 días (lab)	-	Mortalidad (+), LMS ( $\pm$ ), DBF ( $\pm$ ), GST ( $\pm$ ), GPX ( $\pm$ ), AChe ( $\pm$ ), GR ( $\pm$ ),	Maranho y col., (2015)

lipídicos Productos mentales			LPO (±), ADN(±)	
Cafeína Ibuprofeno Carbamazepine Novobiocin	35 días (lab) 35 días (lab) 35 días (lab) 35 días (lab)	0,1-5-15-50 µg/l 0,1-5-10-50 µg/l 0,1-1-10-50 µg/l 0,1-1-10-50 µg/l	LMS (±)	Aguirre–Martínez y <i>col.</i> , (2013)
Ibuprofeno	7 días (lab)	100-500-1000 µg/l	THC (-), diámetro y volumen de hematocitos (no), LDH (+), ADN- fragmentación (no)	Matozzo y <i>col.</i> , (2012)
CBZ	96 h (lab)	0-0,03-0,30-3-9 µg/l	Acumulación (+), LPO (±), GST (±), GR (+), Superoxide dismutase (+), CYP450 (+), mortalidad (no)	Âlmeida y <i>col.</i> , (2014)
Paracetamol	96 h (lab)	0-0,05-0,5-5 mg/l	GST (±), mortalidad (no), GRed(+), TBARs (±)	Antunés y <i>col.</i> , (2013)

## 8. Material de dragado.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
Sedimentos (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn)	28 días (campo)	-	Acumulación (+), daño tejidos branquias y glándula digestiva (+)	Martín-Díaz y <i>col.</i> , (2008)a
Sedimentos (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn, Hg, PCBs, PAHs)	28 días (campo)	-	MTLPs (+), GST (+), No mortalidad, EROD (+), GPx (+), GR (+), acumulación (+)	Martín-Díaz y <i>col.</i> , (2008)b
Sedimentos (As, Cu, Hg, Pb, Zn)	7 días (lab) 14 días (lab)	-	Mortalidad (±), tiempo de enterramiento (+)	Casado-Martínez y <i>col.</i> , (2006)

## 9. Vertido minero.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
Sedimentos (Cd, Cu, Pb, Zn)	10 días (lab)	-	Acumulación (+), necrosis (±), hiperplasia (±), hematocitos infiltración(±), fusi ón de lamellae (+), hipertrofia (+), Enterocitos (±)	Riba y <i>col.</i> , (2005)a

Sedimentos (Cd, Cu, Fe, Mn, Pb)	10-30 días (lab)	-	Acumulación (+)	Riba y <i>col.</i> , (2005)b
Cd Cu Zn	21 días (lab) 21 días (lab) 21 días (lab)	3 µg/l 15 µg/l 700 µg/l	No Mortalidad, acumulación (+), MT (+), daño agallas (+), daño digestivo (+), tejido gonadal (-), daño salinidad (±)	Martín-Díaz y <i>col.</i> , (2004)
Sedimentos (Cd, Cu, Pb, Zn)	10 días (lab)	-	Acumulación (+), mortalidad (±), MT (+)	Riba y <i>col.</i> , (2003)

#### 10. Vertido fuel.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
Sedimentos con Vertido fuel (PAHs, PCBs, Zn, Cd, Pb, Ni, Co)	28 días (campo)	-	GPX (±), GST (±), GR (±), EROD (±)	Morales-Caselles y <i>col.</i> , (2008)a
Agua contaminada con fuel	1-5-24 h (lab)	Diluciones (1/2, 1/4)	Enterramiento (±), - fuel +superviviencia larvas	Mariño y <i>col.</i> , (2003)
Sedimentos (PAHs, PCBs, Zn, Cd, Pb, Cu, Ni)	28 días (lab)	2,5 g	GPX (-), GST (±), EDOD (±), GR (±), FRAP (+)	Morales-Caselles y <i>col.</i> , (2008)b
Sedimentos	10 días (lab)	-	Mortalidad (±), enterramiento (+)	Riba y <i>col.</i> , (2004)

#### 11. PCBs.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
PCBs	0-5-15-30-47-50-60 días (campo)	Algas contaminadas 106 células/l	Acumulación (+), polar lípidos (-), esteroides (-), triglicéridos (+), ácidos grasos libres (±)	Ferreira y <i>col.</i> , (1998)
Sedimentos (PCBs, DDTs, HCHs)	- (campo)	1,08-3,5 ng/g 0,12-0,30 ng/g 0,090-0,30 ng/l	Acumulación (+), Kow (alto)	Choi y <i>col.</i> , (2014)
Se expusieron al medio	14 días (campo) 28 días (campo)	-	Acumulación (+), CAT (+), GSH (+), GST (+), GPX (+),	De Luca-Abbott y <i>col.</i> , (2005)
Sedimentos (PCBs, Pesticidas)	14 días (campo)	-	Acumulación (+)	Choi y <i>col.</i> , (2010)
PCBs, PAHs, y metales pesados	10 meses (campo)	-	Mortalidad (+), acumulación (+)	Moschino y <i>col.</i> , (2010)
Sedimentos (metal traza, PAHs, PCBs)	- (campo)	-	Mortalidad (+), MT (-), lipofusión (-), acumulación (+)	Moschino y <i>col.</i> , (2012)

## 12. Pesticidas.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
Pesticidas	15 días (lab)	0,005-0,05-0,5 µg/l	EDOR (+), GST (+), GSH (+), MDA (+), SOD (-), LPO (+), daño hebras ADN (-)	Tao y col., (2013)
Chropirifos IBP [] Diazinon [] Methidation []	0-8-16-24-36-48 h (lab) 0-8-16-24-36-48 h (lab) 0-8-16-24-36-48 h (lab) 0-8-16-24-36-48 h (lab)	0,1-0,3-0,5-1 mg/l 0,5-1-3-5 mg/l 0,1-0,5-1-2 mg/l 3-5-10-20 mg/l	ChE actividad (-)	Choi y col., (2011)
Agua de afluyente	7-22 días (campo)	-	AchE (+), SFG (-), GR (+), GST (+), CAT (-), LPO (+), acumulación (+)	Campillo y col., (2013)
Sedimentos (PCBs, pesticidas)	2 años (campo)	-	OCPs (+), acumulación (+), DDTs (+)	Wang y col., (2007)
Reldan Roundup	90 días (lab) 90 días (lab)	0,6 µg/l 1,1 µg/l	Alteraciones histológicas	El- Shenawy, y col., (2009)
Sedimentos (con petróleo)	7 días- (lab)	0%, 0,5%, 2%, 8%, 16%, 32%	EDOR (+), GST (+), GPX (+), LPO (+)	Aguirre-Martinez y col., (2014)

## 13. TBTs.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
TBTs	2 años (lab)	50-100-250 µg/l	Crecimiento (-), peso (-), crecimiento concha (anormal), supervivientes (-)	Coelho y col., (2006)
TBTs	7 días (lab)	90-454-2268 ng/l	NADPH-CcR(+), NADH-CcR(-), acumulación (+)	Solé y col., (2000)
TBTs	13 días (lab)  21 días (lab)	0,001-0,055-0,130-0,340-0,061 µg/l  0,01-0,061-0,310 µg/l	% larvas normal (-), no efectos maternos, en las hembras no inhibe el desarrollo larval y la supervivencia larvaria, cambio forma concha (+), reclutamiento (-)	Inoue y col., (2007)
TBTs	21 días (lab)  23 h (lab)	0,01-0,061-0,310-0,350 µg/l  0,01-0,062-0,140-0,320-0,640 µg/l	Desarrollo embrionario (-), acumulación (+), éxito reproductivo (-), TBTs acumulado transferido a los huevos	Inoue y col., (2006)a

TBTs	5 semanas (campo)	-	Acumulación (+), testosterona (+), estradiol (-), masculinización (+)	Morcillo y <i>col.</i> , (2000)
TBTs	7 días (lab)	0,1-0,45-2,27 µg/l	Testosterona (+), estradiol (-), estrógeno (-), masculinización (+), acu (+), 6 alfa y 6 beta hidroxytestosterona (+), androstenediona (+)	Morcillo y <i>col.</i> , (1998)
TBTs	- (campo)	-	Acumulación (+)	Fernández y <i>col.</i> , (2013)
TBTs	28 días (lab)	-	Acumulación (+)	Garg y <i>col.</i> , (2009)
TBTs	- (campo)	-	Acumulación (+), reproducción (-)	Inoue y <i>col.</i> (2006)b
TBTs	0-15-30-60 (min) (lab)	0,01-0,05-0,1 µg/l	Índice fagocitosis (-) Índice amebocitosis (-) actividad lisosomal (-) Beta-glucuronidasa (-)	Cima y <i>col.</i> , (1999)
TBTs	60 min (lab)	0,01-0,05-0,1 µg/l	Fagocitosis (-)	Cima y <i>col.</i> , (1998)

#### 14. PAHs.

Tipo de sustancia	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
Medio natural (PAHs)	0-1-3-7-14-28 días (campo)	-	Acumulación (+), eliminación (+), daño oxidativo (+), GST (±), LPO (+), MIT SOD (±), CYT SOD (±), CAT (-), T-GPX (-), Se-GPx (-)	Bebianno y <i>col.</i> , (2009)
Medio natural (PAHs)	Mensualmente Julio (2007) a Diciembre (2008) (campo)	-	Acumulación (+), MT (+), ALAD actividad (+), Ache (-), LPO (+), ADN daño (+)	Cravo y <i>col.</i> , (2012)
Medio natural (PAHs)	Bianualmente 2004-2005 (campo)	-	Acumulación (+), MT (±), Lipofuscin (±)	Moschino y <i>col.</i> , (2012)
Medio natural (PAHs)	14-28 días (lab)	-	Efecto genotóxico (+), acumulación (+), LPO (±), GSH (+), GSSG (+), GST (+), ADN daño (-)	Martins y <i>col.</i> , (2013)
Medio natural (PAHs)	14-28 días (campo)	-	Acumulación (+), CAT (+), GST (+), GPX (+)	De-Luca Abbott y <i>col.</i> , (2005)

Medio natural (PAHs)	Mensualmente marzo 2009-febrero 2010	-	THC (-), actividad pinocitosis (-), actividad lisomal(+), AChE (-), mortalidad (+), Gil SOD (+), CAT (-)	Matozzo y <i>col.</i> , (2012)
Medio natural (PAHs, Zn, Cd, Pb, Cu, Ni, Co, Hg)	14 días (campo)	-	EROD (+), DBF (+), GST (+), GR (+), GPx (+), LPO (+), daño hembras ADN(+)	Ramos-Gómez y <i>col.</i> , (2011)
Medio natural (PAHs, OPs, OCIs)	1989-1991 (campo)	-	Acumulación (+)	Solé y <i>col.</i> , (2000)
Medio natural (PAHs)	Mensualmente Agosto (1994-1995) (campo)	-	Acumulación (+), MIT SOD (+), CYT SOD (±), CAT (±), T-GPX y Se-GPX (-)	Barreira y <i>col.</i> , (2006)

## 15. Metales.

Metales	Tiempo exposición	Rango de concentración	Respuestas	Referencias
Cd  Zn  Cd+ Zn	48 h (lab) 48 h (lab) 48 h (lab)	20 µg/l 50 µg/l -	GPX - acumulación (+) GPX - acumulación (-) SOD (+), GST (+), acumulación (+)	Ji y <i>col.</i> , (2015)
Agua residual Cu, Cd, Zn	7-14 días (lab)	0-1-3-10 %	Acumulación (+), CAT (+), TBARS (+), GST (+), MT (+), ChE (+)	Kamel y <i>col.</i> , (2012)
Vertido industrial Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Cr, Co, Mn, As, Se	7 días (campo)	-	Acumulación (+). mortalidad (no), CAT (+), GST (+), GPX (-)	Wang y <i>col.</i> , (2012)
Sedimentos (descargas de aguas tratadas) Mn, As, Se, Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Cr, Hg, Al, Fe	14 días (lab)	-	Acumulación (+), mortalidad (+), LMS (-), GST (+), DBF(+), ADN (+), LPO (+), GR (+), GPX (-), AchE (-), EROD (+)	Maranho y <i>col.</i> , (2015)
Cd Cu Zn	25 días (lab) 25 días (lab) 25 días (lab)	100 µg/l 50 µg/l 50 µg/	Acumulación (+), MT (+)	Serafim y <i>col.</i> , (2010)
Vertido Industrial Cu, Cd, Zn	132 días (campo)	-	Acumulación (+), MT (+)	Hamza-Chaffai y <i>col.</i> , (2000)
Cu Cd Zn Hg	214 días (campo)	1.08–6.08 µg l <sup>-1</sup> 13–136 ng l <sup>-1</sup> 0.3–25.1 µg l <sup>-1</sup> 0.5–2.0 µg l <sup>-1</sup>	Acumulación (+), mortalidad (+)	Boudrimont y <i>col.</i> , (2005)
Cu, Cd, Zn	122 días (campo)	-	Acumulación (+), MT (+)	Hamza-Chaffai y <i>col.</i> , (1999)
Bp Cd Cu	96 h (lab) 96 h (lab) 96 h (lab)	5-50 µg l <sup>-1</sup> 10-40 µg l <sup>-1</sup> 10-40 µg l <sup>-1</sup>	CYP414A1 (+)	Zhang y <i>col.</i> , (2012)

Sedimentos (vertido industrial) As, Cu, Cd, Cr, Ni, Hg, Pb, PAHs, PCBs	153 días (campo, 2004) 153 días (campo,2005)	-	Acumulación (+), MT (+)	Moschino y <i>col.</i> , (2012)
Cd Pb Cu	7 días (lab) 7 días (lab) 7 días (lab)	200-600 $\mu\text{g l}^{-1}$ 350-750 $\mu\text{g l}^{-1}$ 10-20 $\mu\text{g l}^{-1}$	Acumulación (+), ALT (+)	Blasco y <i>col.</i> , (1999)
Cu Zn Mn	2-8 días (lab)	-	Acumulación (+), mortalidad (+)	Caro y <i>col.</i> , (2015)
Cd	12 meses (campo)	-	Acumulación (+), MT (+)	Smaui–Damak y <i>col.</i> , (2009)
Cu	4-25 días (lab)	50-75-150-250- 1000-1500-2000. $\mu\text{g l}^{-1}$	Mortalidad (+), acumulación (+), eliminación (+), MT (+)	Serafim y <i>col.</i> , (2009)
Cd	21 días (lab)	40 $\mu\text{g l}^{-1}$	Acumulación (+), PEPs(cambios).	Chora y <i>col.</i> , (2009)
Vertido industrial Cd, Cu, Zn	62 días (campo)	-	Glycogen(±), acumulación (+), MT(±), MDA (±)	Hamza–Chaffai y <i>col.</i> , (2003)
Cd	7 días (lab)	15 $\mu\text{g l}^{-1}$	MT (+), acumulación (+)	Roméo y Gnana Barelli (1997)
Cd	92 días (campo)	-	MT (+), acumulación (+)	Paul Ront y <i>col.</i> , (2010)
Hg Cu Zn Cd	48 h (lab) 48 h (lab) 48 h (lab) 48 h (lab)	4-10 $\mu\text{g l}^{-1}$ 4-10 $\mu\text{g l}^{-1}$ 100-300 $\mu\text{g l}^{-1}$ 200-400 $\mu\text{g l}^{-1}$	Desarrollo embrionario (-), acumulación (+)	Smaoui–Damark y <i>col.</i> , (2004)
Cd	20 días (lab)	100 $\mu\text{g l}^{-1}$	Acumulación (+)	Beiras y <i>col.</i> , (2004)
Cd	(lab)	1-10 ppm/g (sedimento)	Diversidad alélica (+), MT (+)	Sime y <i>col.</i> , (2003)
Cd	5 días (lab)	10-18-32-56-100 $\mu\text{M}$	Mortalidad (+), acumulación (+), CAT (-), MT (+), LPO (+), GST (+), SOD (+), PEPs (=)	Moraga y <i>col.</i> , (2002)
Cd	21 días (lab)	40 $\mu\text{g l}^{-1}$	ROS (+), acumulación (+), ubiquitinación (+), carboxilación (+)	Figueira y <i>col.</i> , (2012)
Cu	96 h (lab)	10-40 $\mu\text{g l}^{-1}$	Cambios metabólicos	Chora y <i>col.</i> , (2008)
Hg	48 h (lab)	20 $\mu\text{g l}^{-1}$	Cambios metabólicos	Zhang y <i>col.</i> , (2011)
Metales			CAT (+), SOD (+), acumulación (+), enterramiento	Liu y <i>col.</i> , (2010)
Cd	40 días (lab)	100 $\mu\text{g l}^{-1}$	MT (+), Mortalidad (no), acumulación (+)	Sacchi y <i>col.</i> , (2013)
Cd	40 días (lab)	400 $\mu\text{g l}^{-1}$	Acumulación (+), MT (+), mortalidad (no)	Bebiamno y <i>col.</i> , (1998)
Mn, As ,Se, Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Cr, Hg	28 días (lab)		Acumulación (+), daños tejidos	Bebiamno y <i>col.</i> , (1993)

-	- lab	-	Cambios material genético	Martín-Díaz y <i>col.</i> , (2008)a
Sedimentos Mn, As, Se, Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Co Hg	14 días (campo)	-	EROD (+), DBF (+), GST (+), GR (+), GPX (-), LPO (+), ADN (+)	Umasuthan y <i>col.</i> , (2012)
Sedimentos Cd	- lab	0,56-1,80-5,60-18-36 mg/kg	Mortalidad (+), enterramiento (-)	Ramos-Gómez y <i>col.</i> , (2011)
Desechos urbanos	12 meses (campo)		Acetilcolinesterasa (±)	Shin y <i>col.</i> , (2002)
Sedimentos Mn, As, Se, Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Co Hg, Fe	9 meses (lab)	-	Longitud del cuerpo (-), desove (-), sexo	Dellali y <i>col.</i> , (2001)
Cu, Zn, Mn, Ni, Cr, Cd, Pb, Fe, As, y Hg	-		Acumulación (+)	Jungyounji y <i>col.</i> , (2006)
Cu Cd	48 h (lab) 48 h (lab)	30-150 µg l <sup>-1</sup> 200-500 µg l <sup>-1</sup>	Acumulación (+)	Usero y <i>col.</i> , (1997)
Sedimentos Mn, As, Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Co, Hg	28 días (lab)	-	Mortalidad (No) MTLP (+), GST (+), EROD (+), GPX (+), GR (-)	Gnassia-Barelli y <i>col.</i> , (1995)
Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Co	62 días (lab)	-	Acumulación	Martín-Díaz y <i>col.</i> , (2008)b
Cu, Cd, Pb, Zn, Hg	20 días (Campo)	-	Acumulación (+)	Liang y <i>col.</i> , (2003)
Sedimentos	48 h (lab)	-	Mortalidad (+)	Zheng y <i>col.</i> , (2012)
Sedimentos	48 h (lab)	-	Mortalidad (+)	Del Valls y <i>col.</i> , (2002)

#### 7.4. Listado de acrónimos y abreviaturas tablas

AChe: Acetilcolinesterasa

AcP: Fosfatasa ácida

ADN: ácido desoxirribonucleico

AGT: Agglutination titer

ALAD: δ-aminolevulinic acid dehydratase

ALP: Fosfatasa alcalina

As: Arsénico

BP: Benzopireno

*C calcitrans*: *Chaetoceros calcitrans*

*C gracilis*: *Chaetoceros gracilis*

*C neogracile*: *Chaetoceros neogracile*

CAT: Catalasa

CBZ: Carbamacepina

ChE: Cholinesterasa

Cl: Cloro

Co: Cobalto

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

COT: Carbono orgánico total

Cr: Cromo

Cu: Cobre

*C vulgaris beji*: *Chlorella vulgaris beji*

CYT SOD: Cytosolic SOD

CYP450: Citocromo P450

DBF: Dibenzilfluoresceína

DDTs: Dichlorodiphenyltrichloroethane

EROD: Etoxi-resofurín desetilasa

Fe: Hierro

FRAP: Ferric reducing ability of plasma

Gil SOD: Gill SOD

GPX: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GRed: Glutathione reductase

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutathione disulphide

GST: Glutación-S-transferasa

h: Hora

Hg: Mercurio

IBP: Iprobenfos



*I galvana: Isochrysis galvana*

Kow: Coeficiente de reparto octanol/agua

Lab: Laboratorio

LAS: Linear alkylbenzene sulfonates

LMS: Lysosomal membrane stability

LPO: Lipid peroxidation

MDA: Malonyldialdehyde

MIT SOD: Mitochondrial SOD

MT: Metalotioneínas

MTLPs: Metallothionein-like-proteins

Mn: Manganio

Mo: Molibdeno

NADH-CcR: NADH cytochrome c reductase

NADPH-CcR: NADPH cytochrome c reductase

NPEO<sub>2.8</sub>: nonilfenol etoxilado

Ni: Níquel

PAHs: Hidrocarburo aromático policíclico

Pb: Plomo

PCB: Bifenilo policlorado

PCDDs: Policlorodibenzo-p-dioxinas

PCDF: Policlorodibenzo-p-furanos

PCP: Personal care product

PEPs: Protein expression profiles

OCPs: Organochlorine pesticides

O<sub>2</sub>: Oxígeno

ROS: Reactive oxygen species

Se: Selenio

SFG: Scope for growth index

SOD: Superoxidase dismutase

TBARSs: Thiobarbituric acid-reactive substances

TBTs: Tributyltin

*T chuii: Tetraselmis chuii*

THC: Total haemocyte count

*T pseudonana: Thalassiosira pseudonana*

*T suecica: Tetraselmis suecica*

Zn: Zinc

## 7.5. Bibliografía tablas

Aguirre-Martínez, G V., Buratti, S., Fabbri, E., Del Valls, T A., Martín-Díaz, M L. (2013). J. Environ. Sci. 25, 1408-1418.

Aguirre-Martínez, G V., Morales-Caselles, C., Del Valls, T A., Martín-Díaz, M L. (2015). Chem. Ecol. 31, 77-91.

Antunes, S C., Freitas, R., Figueira, E., Goncalves, F., Nunes, B. (2013). Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 6658-6666.

Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V I., Schneider, R J., Soares, A M V M., Figueira, E., Freitas, R. (2014). Aquat. Toxicol. 156, 74-87.

Álvarez-Muñoz, D., Sáez, M., Blasco, J., Gómez-Parra, A., González-Mazo, E. (2006). Cienc. Mar. 32, 447-455.

Baudrimont, M., Schäfer, J., Marie, V., Maury, R., Bossy, C., Boudou, A., Blanc, G. (2005). Sci. Total. Environ. 337, 265-280.

Barreira, L A., Mudge, S M., Bebianno, M J. (2006). Inc. Environ. Toxicol. 22, 203-221.

Basallote, M D., Rodríguez-Romero, A., Blasco, J., Del Valls, A., Riba, I. (2012). Environ. Sci. Pollut. Res. 19, 2550-2560.

Bebianno, M J., Nott, J A., Langston, W J. (1993). Aquat. Toxicol. 27, 315-334.

Bebianno, M J. (1995). Sci. Total. Environ. 171, 107-115.

Bebianno, M J., Serafim, M A. (1998). Sci. Total. Environ. 214, 123-131.

Bebianno, M J., Barreira, L A. (2009). Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 1849-1860.

Beiras, R., Albentosa, M. (2004). Aquaculture. 230, 205-213.

Blasco, J., Puppo, J. (1999). Comp. Biochem. Physiol. C. 122, 253-263.

Boscolo, R., Cacciatore, F., Berto, D., Giani, M. (2007). Food. Chem. Toxicol. 45, 1065-1075.

Campillo, J A., Albentosa, M., Valdés, N J., Moreno-González, R., León, V M. (2013). Aquat. Toxicol. 142-143, 365-379.

Caro, A., Chereau, G., Briant, N., Roques, C., Freydier, R., Delpoux, S., Escalas, A., Elbaz-Poulichet, F. (2015). Sci. Total. Environ. 505, 526-534.

Casado-Martínez, M C., Blasco, J., González-Castromil, M A., Riba, I., Del Valls, T A. (2006). Ciencias Marinas. 32, 159-166.

Casatta, N., Mascolo, G., Roscioli, C., Viganò, L. (2015). Sci. Total. Environ. 511, 214-222.

Choi, J Y., Yang, D B., Hong, G H. (2010). Ocean. Polar. Res. 32, 237-245.

Choi, J Y., Yun, J., Yang, D B., Ra, K., Kim, K T., Hong, G H., Shin, K H. (2011). Mar. Environ. Res. 71, 162-168.

Choi, J Y., Yang, D B., Hong, G H., Shin, K H. (2014). Mar. Pollut. Bull. 85, 672-678.

- Chora, S., McDonagh, B., Sheehan, D., Starita-Geribaldi, M., Roméo, M., Bebianno, M J. (2008). *Mar. Environ. Res.* 66, 95-97.
- Chora, S., Starita-Geribaldi, M., Guignonis, J M., Samson, M., Roméo, M., Bebianno, M J. (2009). *Aquat. Toxicol.* 94, 300-308.
- Cima, F., Marín, M G., Matozzo, V., Da Ros, L., Ballarin, L. (1998). *Chemosphere.* 37, 3035-3045.
- Cima, F., Marín, M G., Matozzo, V., Da Ros, L., Ballarin, L. (1999). *Mar. Pollut. Bull.* 39, 112-115.
- Coelho, M R., Langston, W J., Bebianno, M J. (2006). *Chemosphere.* 63, 1499-1505.
- Cravo, A., Pereira, C., Gomes, T., Cardoso, C., Sefaim, A., Almeida, C., Rocha, T., Lopes, B., Company, R., Medeiros, A., Noberto, R., Pereira, R., Araújo, O., Bebianno, M J. (2012). *Mar. Environ. Res.* 75, 23-34.
- da Silva, P M., Hégaret, H., Lambert, C., Wikfors, G H; Le Goïc, N., Shumway, S E., Soudant, P. (2008). *Toxicol.* 51, 563-573.
- De Luca-Abbott, S., Richardson, B J., McClellan, K E., Zheng, G J., Martin, M., Lam, P K S. (2005). *Mar. Pollut. Bull.* 51, 694-707.
- Del Valls, T A., Forja, J M., Gómez-Parra, A. (2002). *Chemosphere.* 46, 1033-1043.
- Dellali, M. Barelli, M G., Romeo, M., Aissa, P. (2001). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 130, 227-235.
- El-Shenawy, N S., Moawad, T I S., Mohallal, M E., Abdel-Nabi, I M., Taha, I A. (2009). *Ocean. Sci. J.* 44, 27-34.
- Fernández-Reiriz, M<sup>a</sup> J., Range, P., Álvarez-Salgado, X A., Labarta, U. (2011). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 433, 97-105.
- Fernández, N., Fernández-Boán, M., Verísimo, P., Freire, J. (2013). *Mar. Pollut. Bull.* 74, 291-301.
- Ferreira, A M., Vale, C. (1998). *Mar. Environ. Res.* 45, 259-268.
- Figueira, E., Cardoso, P., Freitas, R. (2012). *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 156, 80-86.
- Garg, A., Antón-Martín, R., García-Luque, E., Riba, I., Del Valls, T A. (2009). *Ecotoxicology.* 18, 1029-1035.
- Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Puiseux-Dao, S. (1995). *Mar. Environ. Res.* 39, 325-328.
- Hamza-Chaffai, A., Amiard, J C., Cosson, R P. (1999). *Comp. Biochem. Phys. C.* 123, 153-163.
- Hamza-Chaffai, A., Amiard, J C., Pellerin, J., Joux, L., Berthet, B. (2000). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 127, 185-197.
- Hégaret, H., da Silva, P M., Wikfors, G H., Lambert, C., De Bettignies, T., Shumway, S E., Soudant, P. (2007). *Aquat. Toxicol.* 84, 469-479.
- Inoue, S., Abe, S I., Oshima, Y., Kai, N., Honjo, T. (2006)a. *Environ. Toxicol.* 21, 244-249.
- Inoue, S., Oshima, Y., Usuki, H., Hamaguchi, M., Hanamura, Y., Kai, N., Shimasaki, Y., Honjo, T. (2006)b. *Chemosphere.* 63, 881-888.
- Inoue, S., Oshima, Y., Usuki, H., Hamaguchi, M., Hanamura, Y., Kai, N., Shimasaki, Y., Honjo, T. (2007). *Chemosphere.* 66, 1353-1357.
- Ji, J., Choi, H J., Ahn, I Y. (2006). *Mar. Pollut. Bull.* 52, 447-468.
- Ji, C., Cao, L., Li, F. (2015). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 545-554.
- Kamel, N., Jebali, J., Banni, M., Khedher, S B., Chouba, L., Boussetta, H. (2012). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 82, 40-46.
- Kim, D., Choi, K S., Hong, H K., Jiang, Z., Zou, Y., Choi, K Y., Yamasaki, Y., Matsuyama, Y., Yamaguchi, K., Oda, T. (2011). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 2052-2055.
- Li, S C., Wang, W X., Hsieh, D P H. (2002). *Mar. Environ. Res.* 53, 145-160.
- Liang, L N., He, B., Jiang, G B., Chen, D Y., Yao, Z W. (2004). *Sci. Total. Environ.* 324, 105-113.
- Liu, X., Zhang, L., You, L., Cong, M., Zhao, J., Wu, H., Li, C., Liu, D., Yu, J. (2011). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 323-332.
- Maranho, L A., Del Valls, T A., Martín- Díaz, M L. (2015). *Mar. Pollut. Bull.*
- Mariño-Balsa, J C., Pérez, P., Estévez-Blanco, P., Saco-Álvarez, L., Fernández, E., Beiras, R. (2003). *Cienc. Mar.* 29, 115-122.
- Martín-Díaz, M L., Blaco, J., González De Canales, M., Sales, D., Del Valls, T A. (2005). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 233-241.
- Martín-Díaz, M L., Jiménez-Tenorio, N., Sales, D., Del Valls, T A. (2008)a. *Chemosphere.* 71, 1916-1927.
- Martín-Díaz, M L., Blasco, J., Sales, D., Del Valls, T A. (2008)b. *Environ. Pollut.* 151, 631-640.
- Martins, M., Costa, P M., Ferreira, A M., Costa, M H. (2013). *Aquat. Toxicol.* 142-143, 85-95.
- Matozzo, V., Rova, S., Marin, M G. (2012). *Mar. Environ. Res.* 79, 116-121.

- Moraga, D., Mdelgi-Lasram, E., Romdhane, M S., El Abed, A., Boutet, I., Tanguy, A., Auffret, M. (2002). *Mar. Environ. Res.* 54, 521-525.
- Morales-Caselles, C., Martín-Díaz, M L., Riba, I., Sarasquete, C., Del Valls, T A. (2008)a. *Chemosphere.* 72, 819-825.
- Morales-Caselles, C., Martín-Díaz, M L., Riba, I., Sarasquete, C., Del Valls, T A. (2008)b. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1309-1316.
- Morcillo, Y., Ronis, M J J., Porte, C. (1998). *Aquat. Toxicol.* 42, 1-13.
- Morcillo, Y., Porte, C. (2000). *Environ. Pollut.* 107, 47-52.
- Moschino, V., Meneghetti, F., Da Ros, L. (2010). *Aquacult. Int.* 18, 327-337.
- Moschino, V., Dealney, E., Da Ros, L. (2012). *Environ. Pollut.* 171, 52-60.
- Paul-Pont, I., Montaudouin, X., Gonzalez, P., Jude, F., Raymond, N., Paillard, C., Baudrimont, M. (2010). *Environ. Pollut.* 158, 3401-3410.
- Raccanelli, S., Favotto, M., Vio, P. (2008). *Chemosphere.* 73, s166-s170.
- Ramos-Gómez, J., Coz, A., Viguri, J R., Luque, A., Martín-Díaz, M.L., Del Valls, T A. (2011). *Environ. Pollut.* 159, 1914-1922.
- Range, P., Chícharo, M A., Ben-Hamadou, R., Piló, D., Matias, D., Joaquin, S., Oliveira, A P., Chícharo, L. (2011). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 396, 177-184.
- Riba, I., García-Luque, E., Blasco, J., Del Valls, T A. (2003). *Chemical Speciation and Bioavailability.* 15, 101-114.
- Riba, I., Del Valls, T A., Forja, J M., Gómez-Parra, A. (2004). *Environ. Toxicol. Chem.* 48, 233-241.
- Riba, I., Blasco, J., Jiménez-Tenorio, N., González de Canales, M L., Del Valls, T A. (2005)a. *Chemosphere.* 58, 671-682.
- Riba, I., Blasco, J., Jiménez-Tenorio, N., González de Canales, M L., Del Valls, T A. (2005)b. *Chemosphere.* 58, 659-669.
- Rodríguez-Romero, A., Jiménez-Tenorio, N., Basallote, M D., De Orte, M R., Blasco, J., Riba, I. (2014). *Environ. Sci. Technol.* 48, 12292-12301.
- Sacchi, A., Mouneyrac, C., Bolognesi, C., Sciutto, A., Roggieri, P., Fusi, M., Beone, G M., Capri, E. (2013). *Environ. Pollut.* 177, 82-89.
- Sáez, M., León, V M., Gómez-Parra, A., González-Mazo, E. (2000). *J. Chromatogr. A.* 889, 99-104.
- Serafim, A., Bebianno, M J. (2009). *Environ. Res.* 109, 390-399.
- Serafim, A., Bebianno, M J. (2010). *Aquat. Toxicol.* 99, 370-378.
- Sfriso, A., Massimiliano, F., Sonia, C., Chiara, F., Antinio, M. (2005). *Environ. Int.* 31, 1002-1010.
- Sfriso, A., Chiara, F., Raccanelli, S. (2014). *Environ. Pollut.* 184, 290-297.
- Shin, P K S., Ng, A W M, Cheung, R Y H. (2002). *Mar. Pollut. Bull.* 45, 133-139.
- Sime, D C., Bebianno, M J., Moura, J J G. (2003). *Aquat. Toxicol.* 63, 307-318.
- Smaoui-Damak, W., Hamza-Chaffai, A., Bebianno, M J., Amiard, J C. (2004). *Comp. Biochem. Phys. C.* 139, 181-188.
- Smaoui-Damak, W., Berthet, B., Hamza-Chaffai, A. (2009). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1489-1498.
- Solé, M. (2000). *Comp. Biochem. Physiol Part C.* 125, 93-101.
- Tao, Y., Pan, L., Zhang, H., Tian, S. (2013). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 22-30.
- Toba, M., Kosemura, T., Yamakawa, H., Sugiura, Y., Kobayashi, Y. (2008). *Plank. Benth. Res.* 3, 165-173.
- Umasuthan, N., Revathy, K S., Lee, Y., Whang, I., Lee, J. (2012). *Fish Shellfish Immunol.* 32, 513-523.
- Usero, J., González-Regalado, E., Garcia, I. (1997). *Environ. Int.* 23, 291-298.
- Wang, Y., Yang, R., Jiang, G. (2007). *Environ. Pollut.* 146, 100-106.
- Wang, Z., Yan, C., Vulpe, C D., Yan, Y., Chi, Q. (2012). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 90-98.
- Zhang, L., Liu, X., You, L., Zhou, D., Wu, H., Li, L., Zhao, J., Feng, J., Yu, J. (2011). *Mar. Environ. Res.* 72, 33-39.
- Zhang, L., Gan, J., Ke, C., Liu, X., Zhao, J., You, L., Yu, J., Wu, H. (2012). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 85-91.
- Zheng, L., Cui, W., Song, W., Qu, L., Yuan, Y., Yang, D. (2012). *Procedia. Environ. Sci.* 16, 118-124.

